

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

SISBI/UFU



1000219083

DANIELA MARQUES DE LIMA MOTA FERREIRA

*DETECÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS IgA E IgG EM AMOSTRAS
PAREADAS DE SORO E LEITE NA ESTRONGILOIDÍASE HUMANA*

UBERLÂNDIA – MG
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

UNON
616.995.132.2
F323d
TES/MSM

DANIELA MARQUES DE LIMA MOTA FERREIRA

***DETECÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS IgA E IgG EM AMOSTRAS
PAREADAS DE SORO E LEITE NA ESTRONGILOIDÍASE HUMANA***

Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

**Prof^a Dr^a Julia Maria Costa Cruz
Orientadora**

**UBERLÂNDIA – MG
2005**



*“Amamentar é dar vida e amor; é alimentar, confortar,
proteger e comunicar-se com o bebê.”*

Dedicatória

Ao meu esposo Paulo que esteve sempre ao meu lado incentivando, apoiando e compreendendo as minhas escolhas.

À Dr^a Vânia Olivetti Steffen Abdallah que tem sido uma grande amiga e um exemplo de integridade, ética, compromisso e responsabilidade profissional.

Às minhas sobrinhas-afilhadas Isabella, Marianna e Gabriella que enchem a minha vida de encanto e alegria.

Agradecimentos

À Deus pela benção da vida e por esta conquista que foi, acima de tudo, mais uma oportunidade de aprendizado pessoal e profissional.

À minha orientadora Dra. Julia Maria Costa-Cruz pela presença e estímulo constantes e pela sua amizade.

Às pacientes que colaboraram com este trabalho.

Às amigas, Maria do Rosário Gonçalves Pires e Maria das Graças Marçal, do Laboratório de Parasitologia, pela grande colaboração na realização deste trabalho.

Ao amigo Álvaro Ferreira Júnior pela obtenção do parasito.

Ao professor Ednaldo Carvalho Guimarães pelo auxílio na escolha dos testes estatísticos.

À amiga Mônica C. Sapelete pelo auxílio na análise estatística e apresentação dos resultados.

À amiga Rosângela M. Rodrigues pela colaboração na revisão.

Aos funcionários do Laboratório de Parasitologia pela consideração com que me receberam e pelo auxílio prestado.

Aos professores do programa de pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas pelo aprendizado.

Aos professores Ernesto Akio Taketomi, Margareth Leitão Gennari Cardoso e Orlando Cesar Mantese pelas sugestões e correções no exame de qualificação.

Aos colegas do programa de pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas pelo companheirismo.

Aos secretários do programa de pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, João Martins Neto e Lucileide Freitas Queiroz Damásio, pela forma atenciosa com que sempre me receberam.

Aos funcionários do laboratório de análises clínicas do Hospital de Clínicas da UFV, setor de sorologias, pela separação das amostras de soro utilizadas no trabalho.

Aos funcionários da Maternidade do Hospital de Clínicas da UFV pela colaboração.

À Dra. Cláudia Lúcia Carneiro pelo exemplo de amor e dedicação aos nossos pequenos pacientes.

Aos colegas médicos do Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas da UFV pela amizade, pelo incentivo e pela colaboração. Sem vocês, esta conquista não teria sido possível!

A todos os funcionários do Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas da UFV pelo carinho e incentivo.

Aos meus pais, Paulo Roberto e Vicentina, que me ensinaram com seus exemplos e suas limitações grandes virtudes como o amor, a honestidade, a humildade, a perseverança, a ética e a busca pelo conhecimento.

Aos meus sogros Paulo e Eunice pelo carinho e apoio.

À minha irmã Anna Paula e meu cunhado Miller por estarem sempre ao meu lado torcendo pelo meu sucesso.

À minha irmã Fernanda que apesar da distância física encontra-se muito próxima com seu carinho e incentivo.

À minha grande amiga Cristina Palmer Barros pelo afeto e, sobretudo, pela sua amizade.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Aspectos éticos	13
3.2. População estudada	13
3.3. Amostras de fezes	14
3.4. Amostras de soro	14
3.5. Amostras de leite	15
3.6. Diagnóstico parasitológico em amostras de fezes	15
3.6.1. Método de Baermann-Moraes	15
3.6.2. Método de Hoffmann, Pons e Janer	16
3.7. Diagnóstico imunológico	17
3.7.1. Obtenção de <i>S. stercoralis</i>	17
3.7.2. Produção do antígeno para a Imunofluorescência Indireta	18
3.7.3. Produção do antígeno salino para o teste ELISA	18
3.7.4. Teste de Imunofluorescência Indireta	19
3.7.5. Teste ELISA	20
3.8. Análise estatística	21
3.9. Normas de Biossegurança	22
3.10. Retorno à Comunidade	22

4. RESULTADOS	23
4.1. Caracterização dos indivíduos do estudo	23
4.2. Diagnóstico parasitológico	23
4.3. Diagnóstico imunológico	25
4.3.1. Detecção de anticorpos específicos pela RIFI	25
4.3.2. Detecção de anticorpos específicos pelo ELISA	29
4.3.3. Correlação de anticorpos específicos em amostras de soro e leite	31
4.3.4. Concordância dos testes RIFI e ELISA	33
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÕES	43
7. RESUMO	44
8. ABSTRACT	45
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
10. ANEXO I	56
11. ANEXO II	57

1. INTRODUÇÃO

As infecções parasitárias constituem um sério problema de saúde pública nos países em desenvolvimento. A estrogiloidíase é uma infecção intestinal causada pelo nematódeo *Strongyloides stercoralis* com distribuição mundial, sendo mais prevalente nas áreas tropicais e subtropicais (COSTA-CRUZ, 2000; DADA-ADEGBOLA; BAKARE, 2004; FERREIRA, 2003; REY, 2001; SANCHEZ, et al, 2001; UPARANUKRAW; PHONGSRI; MORAKOTE, 1999)'.

Clinicamente, a estrogiloidíase pode persistir por vários anos no hospedeiro humano, usualmente não detectada, pelo comportamento assintomático. Em áreas endêmicas, o curso prolongado da infecção resulta em elevada carga parasitária podendo determinar a ocorrência da síndrome de hiperinfecção sendo que em circunstâncias especiais, principalmente, nos casos de imunodepressão, pode ocorrer disseminação da infecção com a invasão de diferentes órgãos pelas larvas do parasito. Esta entidade constitui um importante problema médico com elevada mortalidade e requer diagnóstico precoce e tratamento agressivo (COSTA-CRUZ, 2000; GROVE, 1996; OLMOS et al., 2004; RAHIM et al., 2005; SAFDAR et al., 2004; SIDDIQUI; BERK, 2001).

O gênero *Strongyloides* apresenta 52 espécies, mas somente duas delas foram descritas como infectantes para o homem: *S. stercoralis* e *S. fuelleborni*. O parasito *S. stercoralis* pode infectar além do homem, cães, gatos e macacos enquanto que *S. fuelleborni* parasita macacos e quase todos os casos de infecção em humanos foram registrados na África e na Ásia. O nematódeo *S. stercoralis* foi descoberto pelo médico Louis A. Normand e descrito pela primeira vez em 1876 por Arthur Bavay nas fezes de soldados franceses retornando da Indochina com diarréia grave (COSTA-CRUZ, 2000; MAHMOUD, 1996; REY, 2001).

O parasito *S. stercoralis* apresenta seis formas evolutivas: fêmea partenogenética parasita, fêmea de vida livre ou estercoral, macho de vida livre, ovos, larvas rabditóide (L2) e filarióide (L3). A estrongiloidíase é uma infecção causada pela fêmea partenogenética parasita que apresenta como habitat normal a parede do intestino delgado encontrando-se mergulhada nas criptas da mucosa duodenal, principalmente nas glândulas de Lieberkühn, onde realiza a postura dos ovos (COSTA-CRUZ, 2000; REY, 2001).

As larvas rabditóides são eliminadas nas fezes do indivíduo parasitado e podem seguir dois ciclos: o direto ou partenogenético e o indireto, sexuado ou de vida livre, ambos monoxênicos. Isto ocorre devido à constituição genética das fêmeas partenogenéticas, que são triplóides ($3n$) e podem produzir, simultaneamente, três tipos de larvas rabditóides (L2): 1) larvas rabditóides triplóides ($3n$), que se transformam em larvas filarióides triplóides infectantes (L3), completando o ciclo direto; 2) larvas rabditóides diplóides ($2n$), que originam as fêmeas de vida livre; e 3) larvas rabditóides haplóides ($1n$), que evoluem para macho de vida livre, estas duas últimas determinando um ciclo indireto. Os ciclos direto e indireto se completam pela penetração ativa das larvas L3 na pele ou mucosa oral, esofágica ou gástrica do hospedeiro sendo que algumas morrem no local, mas o ciclo continua através das larvas que atingem a circulação venosa e linfática seguindo para o coração e os pulmões. As larvas chegam aos capilares pulmonares, onde se transformam em L4, atravessam a membrana alveolar e, através de migração pela árvore brônquica, chegam à faringe. Podem ser eliminadas pela expectoração, que provocam, ou serem deglutidas, atingindo o intestino delgado, onde se transformam em fêmeas partenogenéticas. Os ovos são depositados na mucosa intestinal e as larvas alcançam a luz intestinal. O tempo decorrido desde a penetração da larva filarióide na pele até que ela se torne adulta e comece a eliminar ovos larvados é de

¹ Citações de acordo com a NBR-6023/2002 da Associação Brasileira de Normas e Técnicas. Comissão de Estudos de Documentação, Rio de Janeiro.

aproximadamente 15 a 25 dias (COSTA-CRUZ, 2000; FERREIRA, 1991; FERREIRA; COSTA-CRUZ, 2003; MAHMOUD, 1996; REY, 2001).

A transmissão da estrogiloidíase ocorre na maioria das vezes através da penetração de larvas filarióides infectantes (L3) pela pele ou, ocasionalmente, após a ingestão de água ou alimentos contaminados com a penetração das larvas pelas mucosas, principalmente da boca e do esôfago. No homem ocorre ainda a auto-infecção externa ou exógena em que as larvas rabditóides presentes na região perianal de indivíduos infectados transformam-se em larvas filarióides infectantes e aí penetram, completando o ciclo direto e a auto-infecção interna ou endógena em que as larvas rabditóides, ainda na luz intestinal de indivíduos infectados, transformam-se em larvas filarióides, que penetram na mucosa intestinal (COSTA-CRUZ, 2000; FERREIRA; COSTA-CRUZ, 2003; MAHMOUD, 1996; REY, 2001).

A infecção primária pelo parasito *S. stercoralis* é iniciada pela penetração na pele ou mucosas da larva filarióide infectante. A infecção aguda é usualmente assintomática. A larva migrans é a manifestação cutânea mais freqüente sendo uma reação alérgica à migração da larva na pele que ocorre principalmente na parede abdominal, nádegas e membros inferiores. Este quadro pode permanecer por alguns dias ou até por períodos prolongados (FERREIRA, 1991; FERREIRA, 2003; MAHMOUD, 1996).

A estrogiloidíase pulmonar sintomática decorrente da migração pulmonar da larva é rara. Clinicamente, corresponde à Síndrome de Löffler apresentando-se com tosse, dispnéia, sibilos, eosinofilia no sangue periférico e infiltrados pulmonares ao Raio X de tórax. Após a instalação do verme adulto no trato intestinal, iniciam-se as queixas de dor abdominal, náuseas, diarreia, vômitos e sinais de má absorção e perda de peso. Os achados endoscópicos da estrogiloidíase gastrintestinal incluem edema duodenal com aspecto irregular da mucosa e ulcerações (ANDRADE NETO; ASSEF, 1996; FERREIRA, 1991; FERREIRA, 2003; MAHMOUD, 1996).

A apresentação clínica mais significativa da estrogiloidíase ocorre em pacientes com a hiperinfecção. Devido à invasão maciça dos tecidos pela larva os sinais e sintomas apresentam-se de forma exacerbada e estão relacionados aos órgãos acometidos. As manifestações cutâneas incluem exantema petequisal e purpúrico. O envolvimento pulmonar resulta em tosse, sibilos e hemoptise. Os estudos de imagem pulmonar revelam que a migração da larva é responsável pela sintomatologia, sendo encontrados infiltrados reticulares ou nódulos miliares no Rx de tórax e Tomografia Computadorizada. Nos casos severos ocorre broncopneumonia e existe ainda risco de desenvolvimento de cavitações e abscessos pulmonares em associação a infecções bacterianas. As manifestações gastrintestinais podem incluir além da dor abdominal, anorexia, náuseas, vômitos, diarreia, sinais de esteatorrêia, má absorção, enteropatia perdedora de proteínas e íleo paralítico. Em decorrência da disseminação, o envolvimento de outros órgãos, como o sistema nervoso central, é comum nestes pacientes. A larva tem sido identificada no líquido, dura-máter e espaços epidural, subdural e subaracnóide determinando cefaléia, alteração do nível de consciência, convulsões focais e coma nos casos extremos (ANDRADE NETO; ASSEF, 1996; BENHUR JUNIOR; SERUFO; LAMBERTUCCI, 2004; FERREIRA, 1991; KEISER; NUTMAN, 2004; MAHMOUD, 1996; NAMISATO et al., 2004; SCHAEFFER et al., 2004).

A síndrome de hiperinfecção pode, ainda, apresentar como complicação a infecção bacteriana que ocorre pela invasão do epitélio intestinal danificado pela flora local. Os patógenos mais comuns são *Escherichia coli* e *Klebsiella* sp (ANDRADE NETO; ASSEF, 1996; MAHMOUD, 1996). A eosinofilia é um achado significativo da infecção humana por *S. stercoralis*, entretanto, a síndrome de hiperinfecção ocorre principalmente em indivíduos imunodeprimidos com pouca ou, nenhuma habilidade, em elaborar uma resposta eosinofílica (KEISER; NUTMAN, 2004; MAHMOUD, 1996).

Uma vez que a estrogiloidíase é na maioria das vezes assintomática e os sintomas quando presentes são inespecíficos, podendo ser comuns a outras doenças parasitárias, o diagnóstico clínico de fato é incerto, sendo necessário a utilização de exames complementares (RAHIM et al., 2005; SIDDIQUI; BERK, 2001; SUDARSHI et al., 2003).

O diagnóstico definitivo é realizado pelo achado do parasito, usualmente nas fezes. A identificação torna-se mais acurada quando os parasitos adultos, assim como os estágios larvais, são avaliados pelo exame morfológico direto, sendo isto raramente possível (GROVE, 1996), uma vez que, o parasito é encontrado em número pequeno na grande maioria das pessoas e a liberação larval nas fezes é pequena e irregular. Por isso, o diagnóstico parasitológico convencional da infecção pelo *S. stercoralis* é pouco sensível e de difícil realização (RAVI et al., 2002; SATO, 1995; SUDARSHI et al., 2003).

Várias técnicas têm sido utilizadas para demonstrar as formas larvárias nas fezes, incluindo o esfregaço fecal direto em solução salina, concentração formol-éter, método Baermann-Moraes, método de Rugai, cultura em papel de filtro (Harada-Mori) e cultura em placa de ágar (GROVE, 1996; NEVES, 2000; RUGAI; MATTOS; BRISOLA, 1954; SALAZAR; GUTIERREZ; BERK, 1995; UPARANUKRAW; PHONGSRI; MORAKOTE, 1999).

Os métodos convencionais como o esfregaço fecal direto e o método de concentração formol-éter possuem baixa sensibilidade para o diagnóstico da estrogiloidíase sendo que o método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) mostra uma maior sensibilidade. Este método baseia-se no hidro e termotropismo das larvas e requer de três a sete amostras de fezes para diagnóstico dos indivíduos infectados (ANDRADE NETO; ASSEF, 1996; UPARANUKRAW; PHONGSRI; MORAKOTE, 1999).

Nos últimos anos foram desenvolvidas várias técnicas de cultura dos helmintos baseadas no desenvolvimento do seu ciclo indireto, nas quais uma segunda geração com

grande quantidade de larvas é produzida, facilitando o diagnóstico. O método inicialmente descrito foi o de Harada-Mori, em que as fezes são espalhadas em uma tira de papel de filtro e cultivadas em um tubo contendo pequena quantidade de água. As larvas aparecem na água após um período de incubação de sete a dez dias (NEVES, 2000). Foram descritas outras variações deste método utilizando placas de Petri com ágar líquido ou sólido (LIU; WELLER, 1993).

Apesar dos métodos de cultivo terem se mostrado bastante sensíveis em laboratórios de pesquisa há dúvidas sobre a praticidade do seu uso rotineiro devido à sua complexidade, custo, demora na obtenção dos resultados e risco de infecção pela manipulação de larvas viáveis (ANDRADE NETO; ASSEF, 1996).

Diante das dificuldades dos diversos métodos parasitológicos no diagnóstico da estrogiloidíase, sobretudo pelo caráter intermitente de eliminação das larvas no indivíduo cronicamente infectado (RAVI et al., 2002), os exames sorológicos para detecção de anticorpos contra antígenos específicos de *S. stercoralis* têm sido úteis para o auxílio diagnóstico desta parasitose (MERCADO et al., 2002; SIDDIQUI; BERK, 2001).

Vários ensaios imunológicos têm sido desenvolvidos ao longo dos anos, incluindo testes intradérmicos com extratos larvais (NEVA et al., 2001; PIRES; DREYER, 1993), imunofluorescência indireta utilizando larvas mortas (MACHADO et al., 2001; COSTA-CRUZ; MACHADO; CAMPOS, 1998; COSTA-CRUZ et al., 1997; COSTA-CRUZ et al., 1999; CAMPOS et al., 1988), hemaglutinação indireta de partículas de gelatina (SATO et al., 1991), “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) (BRASIL et al., 1988; COSTA-CRUZ et al., 1998; COSTA-CRUZ et al., 1999; MACHADO et al., 2003; MERCADO et al., 2002) e “Western Blotting” (GENTA et al., 1988; LINDO et al., 1994; SILVA et al., 2003).

Uma das principais limitações dos testes sorológicos é a dificuldade em se obter quantidades suficientes de antígenos que permitam o seu fracionamento e análise, principalmente a obtenção de larvas de *S. stercoralis* (ROSSI et al., 1993; RAVI et al., 2002). O uso de outras espécies de *Strongyloides* (COSTA-CRUZ et al., 1997; GROVE; BLAIR, 1981; MACHADO, et al., 2001; MACHADO et al., 2003) e de antígenos recombinantes (RAVI et al., 2002) têm facilitado a resolução deste problema. Outra limitação dos testes sorológicos é o fenômeno da “reatividade cruzada” que se explica pela maior complexidade antigênica apresentada pelos parasitos em relação às bactérias e protozoários (CAMPOS et al., 1988; KOOSHA; FESHARAKI; ROKNI, 2004; SIDDIQUI; BERK, 2001).

Ainda na tentativa de facilitar o diagnóstico da estrogiloidíase humana tem-se explorado a utilização de fluidos corporais alternativos, como a saliva (COSTA et al., 2003), sendo observado que a detecção de IgA específica na saliva pela reação de imunofluorescência indireta pode ser utilizada como auxílio diagnóstico.

A prevalência global da estrogiloidíase é estimada em 100 milhões de casos variando consideravelmente nas diferentes áreas e nas diferentes populações sendo pouco estudada no segmento materno-infantil (MAHMOUD, 1996; FERREIRA, 2003). As gestantes e as crianças têm-se mostrado alvos da infecção parasitária com repercussões significantes (HEATON et al., 2002). Todavia, trabalhos sobre o parasitismo em gestantes e crianças menores de dois anos, sobretudo no período neonatal são escassos (DADA-ADEGBOLA; BAKARE, 2004; D’ALAURO et al., 1985; MACEDO; REY, 1997; MACEDO; REY, 2000). Na América Latina existem alguns relatos sobre a ocorrência de estrogiloidíase nestes grupos. Na Argentina a prevalência variou de 2% em crianças em idade escolar (BORDA, 1996) a 83,3% em crianças de zero a quatro anos de idade (TARANTO; FILLIPPI; ORIONE, 1993). No Brasil, estudo realizado no Rio de Janeiro mostrou prevalência de 4,8% em gestantes e 9,6% em puérperas (MACEDO; REY, 1996). Na cidade de Uberlândia – Minas

Gerais foi encontrado prevalência de 2,4% em gestantes (SANTOS et al., 1998) e em crianças a prevalência variou de 3,3% (PAULA et al., 2000) em menores de 12 anos hospitalizados a 13% (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998) em menores de 7 anos freqüentadores de creches.

Milhões de mulheres grávidas são portadoras de infecções intestinais parasitárias crônicas e nos países em desenvolvimento até 90% das mulheres podem ser afetadas durante o ciclo gravídico-puerperal (VILLAR; KLEBANOFF; KESTLER, 1989). A capacidade reprodutiva humana é raramente afetada, mas em países com baixos padrões sócio-econômico-culturais a associação com a desnutrição materna pode contribuir consideravelmente para um prognóstico desfavorável para a mãe e sua criança. As infecções parasitárias intestinais, incluindo a estrogiloidíase, podem causar retardo de crescimento intra-uterino, parto prematuro, infecção fetal e neonatal (MACEDO; REY, 1996; VILLAR; KLEBANOFF; KESTLER, 1989).

O sistema imune não está completamente desenvolvido ao nascimento, principalmente nos recém-nascidos prematuros, sendo esta a principal causa da elevada morbidade e mortalidade neonatal relacionada às infecções (FIELD, 2005; SCHELONKA; INFANTE, 1998; XANTHOU, 1998). No período neonatal, os níveis séricos de IgM e IgA são muito reduzidos, a produção de anticorpos de classe IgG é ainda deficiente, as várias frações do sistema complemento estão em concentrações baixas no soro e o sistema imune associado às mucosas é pouco eficaz (ADDERSON et al., 1992; CARVALHO; NUDELMAN, CARNEIRO-SAMPAIO, 1998; GOLDMAN et al., 1994; HANSON; KOROTKOVA, 2002; ROGNUM; THRANE; STOLTENBERG, 1992). No aspecto celular, existem numerosas evidências da imaturidade funcional dos fagócitos e linfócitos T e uma baixa produção de citocinas principalmente interferon γ e interleucina 6 (GOLDMAN et al., 1994; HANSON; KOROTKOVA, 2002; WILSON; WESTFALL; JOHNSON, 1986; YACHIE; TAKANO; OHTA, 1992). Dessa forma, a possibilidade de infecção pelo *S. stercoralis* no período

neonatal ou nos primeiros meses de vida constitui um agravo à saúde da criança em um período da vida em que o sistema imunológico é ainda incapaz para o desempenho pleno de suas funções.

O aleitamento materno é a prática mais segura e natural de alimentar as crianças, nos primeiros seis meses de vida, atendendo a todas as suas necessidades nutricionais e imunológicas. Vários estudos têm demonstrado que o leite humano pode aumentar os mecanismos de defesa do recém-nascido contra os diferentes agentes infecciosos por prover fatores imunológicos não específicos assim como substâncias protetoras não imunológicas (CLEARY, 2004; FIELD, 2005; GOLDMAN, 1993; XANTHOU, 1998). As propriedades anti-infecciosas do colostro e leite maduro devem-se tanto aos componentes solúveis quanto aos celulares (GOLDMANN et al., 1986; NASCIMENTO; ISSLER, 2003). Os componentes solúveis específicos são as imunoglobulinas da classe IgA, IgM, IgG e IgE. Os componentes solúveis inespecíficos do leite humano incluem lisozima, lactoferrina, fator bifido, lactoperoxidase, interferon, proteínas do sistema complemento, fator anti-estafilocócico e outras substâncias imunoreguladoras. Os macrófagos, monócitos, linfócitos T e B, eosinófilos, neutrófilos, granulócitos e células epiteliais são os componentes celulares cuja concentração é alta no colostro e diminui no leite maduro (GOLDMAN et al., 1994; HANSON; KOROTKOVA, 2002).

As imunoglobulinas do leite humano, quando comparadas às do soro, apresentam diferenças quantitativas e qualitativas, sendo as concentrações muito elevadas no colostro. Constituem a maior parte do conteúdo protéico desta secreção, chegando a alcançar mais de 90% no primeiro dia de lactação, com declínio acentuado até o terceiro dia (GRASSI; COSTA; COSTA VAZ, 2001; XANTHOU, 1998).

As moléculas de IgG e IgM do leite humano apresentam estrutura semelhante à do soro materno sendo, na sua maior parte, dele originadas. O nível de IgG encontrado no leite

humano varia de 1 a 4 mg/dl, sendo significativamente menor quando comparado ao nível sérico materno. A IgG pode ativar o sistema complemento e participar da citotoxicidade dependente de anticorpo. Esta imunoglobulina apresenta ação contra vírus, parasitas e toxinas bacterianas (GRASSI; COSTA; COSTA-VAZ, 2001; XANTHOU, 1998).

A IgM encontra-se em concentração inferior a 25mg/dl no leite humano. Existem dúvidas quanto ao local de produção da IgM, mas algumas evidências falam a favor de uma produção pela própria glândula mamária. Apresenta atividade contra agentes infecciosos e embora em pequena quantidade, pode ser muito importante na proteção inicial dos recém-nascidos expostos a infecção materna (HAMOSH, 2001; WOLD; ADLERBERTH, 2000).

A IgE tem sido detectada no leite humano, nos primeiros cinco a seis dias de lactação, em concentrações até vinte vezes maiores que as séricas; o que pode indicar transporte seletivo ou produção local (GRASSI; COSTA; COSTA-VAZ, 2001; XANTHOU, 1998). Os anticorpos IgE encontrados no leite humano, ligam-se aos antígenos presentes no lúmen intestinal, o que resulta em migração de mediadores inflamatórios e acarreta aumento da permeabilidade vascular. Assim, facilitam a passagem dos anticorpos IgG do sangue para o lúmen intestinal, com inativação dos antígenos presentes na mucosa (GRASSI; COSTA; COSTA-VAZ, 2001; XANTHOU, 1998).

A IgA é a principal imunoglobulina do leite humano, onde se encontra predominantemente em sua forma dimérica. As duas moléculas de IgA estão unidas à cadeia J e ao componente secretor ou peça de transporte, formando o complexo dimérico IgA-secretor. Este resultante é mais estável e resistente à digestão péptica. Segundo Wold e Adleberth (2000), a IgA secretora resiste à degradação proteolítica no trato gastrintestinal. A produção materna é de aproximadamente 2 a 3 gramas por dia, sendo que o recém-nascido em aleitamento materno exclusivo recebe 0,5 a 1 grama por dia (GRASSI; COSTA; COSTA-VAZ, 2001; WOLD; ADLERBERTH, 2000; XANTHOU, 1998).

A nutriz secreta no leite IgA específica que protege a criança de patógenos aos quais tenha se exposto durante toda a vida. A glândula mamária faz parte de um sistema de tecidos linfóides associados à mucosa (mucosa-associated lymphoid tissue – MALT) que inclui o intestino, os pulmões, as glândulas lacrimais, salivares e mamárias e o trato genital. O conceito de MALT implica que a imunização de um sítio pode ser efetivamente transferida a sítios distantes pelo trânsito de células, especialmente linfócitos. A glândula mamária pode agir como uma extensão do tecido linfóide associado ao intestino (gut-associated lymphoid tissue – GALT) e do tecido linfóide associado aos brônquios (broncho-associated lymphoid tissue – BALT), conferindo proteção contra infecções comuns em crianças como diarreias e doenças respiratórias agudas (CALVANO, 2002; GOLDMAN et al., 1994; GRASSI; COSTA; COSTA-VAZ, 2001; XANTHOU, 1998).

A maioria dos microorganismos entra em contato com o recém-nascido através das mucosas, principalmente, a do trato gastrointestinal. A existência do “sistema imune enteromamário e broncomamário” confere ao leite uma especificidade de anticorpos contra microorganismos presentes no ambiente da mãe e que também estarão presentes no ambiente do recém-nascido. É uma especificidade única e crítica para o sistema imune do recém-nascido que nenhuma fórmula alimentar artificial pode substituir (CALVANO, 2002; FIELD, 2005). Tem sido descrita IgA secretora no leite humano contra vários patógenos incluindo *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella* sp, *Salmonella* sp, *Clostridium difficile*, *Giardia lamblia*, *Schistosoma mansoni*, *Campylobacter* sp, rotavírus e poliovírus, entretanto, não existem, até o presente momento, relatos considerando a presença de anticorpos específicos contra *S. stercoralis* (ATTALAH et al., 2003; CALVANO, 2002; MIOTTI, et al., 1985; NASCIMENTO; ISSLER, 2003; NOGUERA-OBENZA et al., 2003; VAN de PERRE, 2003).

2. OBJETIVOS

Detectar anticorpos específicos IgA e IgG anti-*S. stercoralis* em amostras pareadas de soro e leite de puérperas, utilizando-se da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

Detectar anticorpos específicos IgA e IgG anti-*S. stercoralis* em amostras pareadas de soro e leite de puérperas, utilizando-se do Teste Imunoenzimático (ELISA).

Comparar os resultados dos testes imunológicos na detecção de anticorpos específicos IgA e IgG anti- *S. stercoralis* em amostras de soro e leite de puérperas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (ANEXO I).

3.2. População estudada

No período de outubro 2003 a novembro de 2004 as puérperas internadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC UFU) foram consultadas previamente sobre a disponibilidade de participar do estudo e as que concordaram assinaram um termo de consentimento (ANEXO II). Foram incluídas as mães clinicamente saudáveis e cujos recém-nascidos eram de termo, saudáveis e se encontravam internados em sistema de Alojamento Conjunto.

As amostras de soro das puérperas foram submetidas ao teste ELISA para detecção de IgG específica anti-*S. stercoralis* e as mães que apresentavam sorologia positiva foram contactadas por telefone ou visita domiciliar para que colhessem 3 amostras de fezes e 1 amostra de leite materno. Foi possível coletar as amostras de 36 pacientes com sorologia positiva. Procedeu-se ainda à coleta aleatória de amostras de 54 puérperas com sorologia negativa.

Foram então analisadas 90 puérperas divididas em dois grupos:

Grupo I – 36 puérperas com IgG específica anti-*S. stercoralis* positiva no teste ELISA.

Grupo II – 54 puérperas com IgG específica anti-*S. stercoralis* negativa no teste ELISA.

3.3. Amostras de fezes

Foram colhidas três amostras de fezes em dias consecutivos, de todas as puérperas estudadas. As fezes foram coletadas em recipiente plástico, sem conservante e mantidas a 4°C até a coleta da terceira amostra quando o material foi homogeneizado e processado para análise. O diagnóstico parasitológico foi realizado pelo método de Baermann (1917)-Moraes (1948). Em seguida foi adicionada uma solução de formalina a 10% ao restante da amostra para que a análise pelo método de sedimentação de Hoffmann, Pons e Janer (1934) fosse feita posteriormente.

3.4. Amostras de soro

Foi utilizada parte das amostras coletadas rotineiramente no Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do HC UFU de todas as gestantes no momento da internação para o parto para realização de anti-HIV e VDRL conforme orientação do Ministério da Saúde. As amostras foram mantidas a -20°C até o momento da realização dos testes imunológicos.

Como padrões positivos foram utilizadas três amostras de soro de três puérperas que estavam eliminando larvas de *S. stercoralis* nas fezes e como padrões negativos, três amostras de soro de três puérperas sadias que apresentavam exames coproparasitológicos e sorologias negativas para *S. stercoralis*.

3.5. Amostras de leite

O leite foi coletado por ordenha manual entre a segunda e quarta semana após o parto, pela manhã, no intervalo entre duas mamadas. Foi colhido um volume de aproximadamente 10 ml por puérpera. As amostras de leite foram centrifugadas a 2500 rpm a 4°C durante 10 minutos (Sorvall RC 5C Plus, EUA). A porção gordurosa foi retirada da superfície e desprezada. As amostras foram conservadas a -20°C até o momento da realização dos testes imunológicos.

Como padrões positivos foram utilizadas três amostras de leite de três puérperas que estavam eliminando larvas de *S. stercoralis* nas fezes e como padrões negativos, três amostras de leite de três puérperas sadias que apresentavam exames coproparasitológicos e sorologias negativas para *S. stercoralis*.

3.6. Diagnóstico parasitológico em amostras de fezes

3.6.1. Método de Baermann (1917)-Moraes (1948)

Aproximadamente 10 gramas de fezes foram colocadas numa gaze dobrada em quatro sobre uma tela metálica com 100 malhas por cm². Em seguida, colocou-se o material assim preparado num funil de vidro, com diâmetro de 11,5 cm em cuja haste foi colocada uma mangueira de borracha de 10 cm, obliterada com pinça, contendo água a 45°C até a borda, e deixado a gaze com o material fecal em contato com a água em repouso por uma hora. Findo esse tempo, coletou-se 2 ml de água abrindo-se a pinça que obliterava a mangueira de borracha. A água foi colhida em tubo de vidro, acrescentado 0,2 ml de solução formalina 10%

para imobilizar as possíveis larvas e centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos. O sedimento foi colhido e depositado em uma lâmina de vidro, acrescido de uma gota de lugol, homogeneizado e coberto por uma lamínula (24 x 24 mm) para exame em microscópio óptico (Olympus, CH-2, Japão) nos aumentos de 100 e 400 vezes (100 e 400X). Foram preparadas três lâminas referentes ao material homogeneizado colhido de cada puérpera e analisadas por dois examinadores.

3.6.2. Método de Hoffmann, Pons e Janer (1934)

Aproximadamente 2 gramas de fezes foram colocadas em um “becker” com cerca de 5 ml de água e triturados com bastão de vidro. Em seguida acrescentou-se 20ml de água, filtrando a suspensão resultante para um cálice cônico de 200 ml de capacidade, utilizando-se uma tela de náilon com cerca de 80 a 100 malhas por cm² com gaze cirúrgica dobrada em quatro.

Os resíduos contidos na gaze foram lavados com 20 ml de água sob agitação constante com bastão de vidro, sendo o líquido da lavagem recolhido no mesmo cálice e completado com água para 200 ml. Esta suspensão de fezes permaneceu em repouso durante 24 horas. Findo esse tempo, uma gota do sedimento foi colocada em uma lâmina de microscopia com uma gota de lugol, homogeneizado, coberto por uma lamínula (24 x 24 mm) e examinado em microscópio óptico (Olympus CH-2, Japão) em aumentos de 100 e 400X.

Três lâminas foram preparadas referentes ao material colhido de cada puérpera e analisadas por dois examinadores.

3.7. Diagnóstico imunológico

3.7.1. Obtenção de *S. stercoralis*

O parasito *S. stercoralis* obtido de fezes humanas foi mantido em cães por inoculação experimental. Os animais foram submetidos a imunossupressão com Prednisolona 2mg/kg. No 7º dia após início do medicamento, foi realizada inoculação dos cães através da injeção de 1 ml de suspensão contendo 2000 larvas de *S. stercoralis* (L3) por via subcutânea.

Após inoculação os cães foram mantidos em gaiolas metálicas e a partir do 15º dia foi iniciada a coleta das fezes e realizado o cultivo pelo método de Loos (NEVES, 2000).

O método de Loos consiste em misturar partes iguais de fezes e carvão mineral ou vegetal, triturados em grãos pequenos. A mistura é colocada em placas de Petri e deixada em repouso à temperatura de 25°C devendo ser ligeiramente umidificada diariamente. No estudo foi utilizado vermiculita, ao invés do carvão, para cultivo das larvas.

No quinto dia de cultura foram obtidas as larvas pelo método de Baermann-Moraes sendo o material concentrado por centrifugação (Fanem, São Paulo) a 1500 rpm durante 5 minutos. A contagem de larvas foi realizada mediante leitura em microscópio óptico (Olympus CH-2, Japão) em aumento de 100X de três lâminas contendo cada uma 5µl de suspensão de parasitas. Calculando-se a média entre as lâminas, encontrou-se a quantidade de larvas existentes em 1 ml.

Parte das larvas (L3) obtidas foi utilizada para a manutenção do ciclo evolutivo de *S. stercoralis* em cães e a outra parte foi mantida à -20°C para o preparo dos antígenos.

3.7.2. Produção do antígeno para Imunofluorescência Indireta

As larvas de *S. stercoralis* (L3), obtidas conforme descrito anteriormente, foram incluídas em “Tissue Teck” (Polyvinyl alcohol, polyethylene glycol) (Miles, Elkahart, EUA) e submetidas a cortes de 4 micra de espessura, em criostato (Cryocut 1800, Reichert-Jung, Alemanha) a -18°C . Os cortes foram depositados em lâminas de microscopia, previamente desengorduradas com álcool-éter PA v/v, secas à temperatura ambiente e conservadas à -20°C , até o momento do uso (COSTA-CRUZ et al., 1997). Foram utilizadas as lâminas que continham no mínimo cinco cortes de larvas visualizadas ao aumento de 200X.

3.7.3. Produção do antígeno salino para o teste ELISA

As larvas de *S. stercoralis* (L3), obtidas conforme descrito anteriormente, foram descongeladas e ressuspensas em solução salina 0,15M tamponada com fosfato pH 7,2 (PBS). A seguir, 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, Brasil) a 40 kHz em 4 períodos de 20 segundos em banho de gelo. Após isotonização com 5 ml de solução de NaCl (0,3M) as larvas passaram por mais 3 períodos de ultra som. O material foi deixado sob agitação por 18 horas à 4°C para extração dos antígenos e a seguir, centrifugado a 10000 rpm por 30 minutos. O conteúdo protéico do sobrenadante foi dosado através do método de Lowry et al (1951).

3.7.4. Teste de Imunofluorescência Indireta

O teste de imunofluorescência indireta para detecção de IgG no foro foi realizado segundo previamente descrito por Costa-Cruz et al. (1997). Para padronização do teste de imunofluorescência indireta no leite, diferentes diluições das amostras de leite, dos conjugados e diferentes tempos de incubação, foram previamente avaliados.

Às lâminas contendo cortes de larvas de *S. stercoralis* foram adicionados soro e leite padrão positivo e negativo diluídos em PBS. A diluição ideal foi de 1:10 para IgA e 1:20 para IgG nas amostras de soro e 1:2 para IgA e 1:4 para IgG nas amostras de leite. Após o tempo ideal de incubação de 30 minutos para amostras de soro e de 45 minutos para amostras de leite a 37°C em câmara úmida as lâminas foram lavadas em PBS por cinco minutos (3 vezes), sendo adicionados respectivamente, os conjugados anti-IgA (Calbiochem®, Merck, Alemanha) e anti-IgG (Laborclin, Brasil) humanos marcados com fluoresceína, diluídos em solução de PBS e azul de Evans a 3%, nas diluições ideais de 1:10 para anti-IgA no soro e leite e 1:30 para anti-IgG no soro e leite. Após 30 minutos de incubação a 37°C as lâminas foram novamente lavadas em PBS por 3 vezes e montadas em glicerina alcalina pH 9,6. As reações foram avaliadas em microscópio de imunofluorescência (ZEISS, Axiolab, Alemanha) de acordo com a fluorescência de controles positivos e negativos, sendo os resultados expressos em títulos. Foram consideradas positivas as amostras de soros com títulos ≥ 10 para IgA e ≥ 20 para IgG e amostras de leite com títulos ≥ 2 para IgA e ≥ 4 para IgG. As amostras positivas foram diluídas na razão 2 para titulação dos anticorpos.

3.7.5. Teste ELISA

O teste ELISA para detecção de IgG no foro foi realizado segundo previamente descrito por Silva et al. (2003). Para padronização do teste de ELISA no leite, diferentes diluições das amostras de leite, dos conjugados e diferentes tempos de incubação, foram previamente avaliados.

Microplacas de poliestireno (DIFCO, Interlab, São Paulo, Brasil) foram utilizadas como suporte para adsorção de 50 μL do antígeno salino de *S. stercoralis* na concentração ideal de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ isoladamente. As placas foram sensibilizadas a 4°C durante 18 horas em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M, pH 9,6. Após este período as placas foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos, com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS/T) e adicionado 50 μL de soro nas diluições 1:20 (IgA) e 1:200 (IgG). Para as amostras de leite, as placas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% (Molico, Nestlé) e a seguir adicionados 50 μL das amostras de leite diluídas 1:10 (IgA) e 1:5 (IgG) em PBS/T. Após incubação por 45 minutos em câmara úmida a 37°C para as amostras de soro e por 1 hora para as amostras de leite, seguiu-se três lavagens de 5 minutos com PBS/T para posterior adição de 50 μL do conjugado anti-IgA e anti-IgG humanas marcados com peroxidase cadeia Fc específica (Sigma, St. Louis, EUA), nas diluições ótimas de 1000 para IgA, 2000 para IgG nas amostras de soro e 1000 para IgA e para IgG nas amostras de leite, por período ideal de 45 minutos a 37°C. Após três lavagens de cinco minutos em PBS/T, a reação foi revelada pela adição de 50 μL do substrato H_2O_2 a 30% e solução cromógena de ortofenileno diamina (Merck, Alemanha) (10 μL de H_2O_2 30% + 10 mg de OPD + 25 mL de tampão citrato fosfato 0,1 M pH 5,0). Após 15 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de 25 μL de solução 2 N de H_2SO_4 (Merck, Alemanha). A reatividade foi determinada através da medida da densidade óptica a 490 nm em leitor ELISA (Metrolab, Argentina). O valor de

“cut off” foi definido pela média aritmética acrescida de dois desvios-padrão (DP), das densidades ópticas das amostras de três amostras padrão negativo (BASSI et al., 1991).

Os valores foram arbitrariamente expressos como Índice ELISA (IE) e calculados através da seguinte fórmula: $IE = (\text{absorbância da amostra testada} / \text{cut off})$. Valores de Índice ELISA maiores que 1 foram considerados positivos.

3.8. Análise estatística

Os resultados foram descritos em termos de média geométrica e intervalo de confiança (IC) de 95%. Comparações entre diferentes médias geométricas dos níveis de anticorpos específicos IgA e IgG anti-*Strongyloides* determinados pelo teste ELISA foram analisados segundo o teste *t* de Student.

Dados de correlação entre amostras de soro e leite humano para os anticorpos específicos IgA e IgG anti-*S. stercoralis* foram apresentados segundo o teste de Correlação de Pearson.

Diferentes positivities dos testes RIFI e ELISA para as imunoglobulinas estudadas em amostras de soro e leite e a concordância e discordância dos dois testes foram analisadas pela diferença entre duas proporções (Estatística Z).

O teste *t* de Student foi também utilizado para comparação da média de idade entre os grupos.

Foram considerados significantes valores de $p < 0,05$.

3.9. Normas de Biossegurança

Todos os processos de coleta, manuseio do material biológico e dos reagentes bem como a utilização dos equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis descritas por Chaves-Borges; Mineo (1997).

3.10. Retorno à Comunidade

Os resultados dos exames parasitológicos foram encaminhados a todas as puérperas e os casos positivos foram comunicados ao médico responsável para que o tratamento específico fosse realizado.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização dos indivíduos em estudo

A média de idade das 90 puérperas participantes do estudo foi de $25,2 \pm 5,8$ anos (média \pm desvio padrão). Analisando-se os grupos separadamente não houve diferença com relação à média das idades nos grupos I ($25,5 \pm 4,7$ anos) e II ($25,0 \pm 6,4$ anos). A tabela 1 apresenta a distribuição por faixa etária dos grupos I e II.

Tabela 1. Distribuição das puérperas dos grupos I ($n = 36$) e II ($n = 54$) de acordo com a faixa etária.

Faixa Etária (anos)	Grupo I n (%)	Grupo II n (%)
≤ 15	0	1 (1,85)
16-25	14 (38,9)	30 (55,6)
26-35	22 (61,1)	17 (31,5)
> 36	0	6 (11,1)
TOTAL	36 (100)	54 (100)

4.2. Diagnóstico parasitológico

As amostras de fezes foram analisadas pelos métodos de Baermann-Moraes e Hoffmann, Pons e Janer. Foram preparadas três lâminas referentes às amostras homogeneizadas de cada puérpera para cada método utilizado totalizando 540 lâminas que

foram analisadas por 2 examinadores. Considerando o método de Baermann-Moraes todos os exames foram negativos e pelo método de Hoffmann, Pons e Janer foram identificados 11 parasitos em diferentes pacientes correspondendo a 12,2% de infecção parasitária nas 90 puérperas com a seguinte distribuição: 4 pacientes com *S. stercoralis* (4,4%), 3 pacientes com ancilostomídeos (3,3%) , 1 paciente com *Taenia* sp (1,1%), 1 paciente com *Enterobius vermicularis* (1,1%), 1 paciente com *Giardia lamblia* (1,1%) e 1 paciente com *Hymenolepis nana* (1,1%).

Todas as pacientes infectadas com *S. stercoralis*, assim como uma das pacientes infectadas com ancilostomídeo, pertenciam ao grupo I. As demais parasitoses foram observadas nas pacientes do grupo II (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição da freqüência de parasitoses intestinais diagnosticadas pelo exame parasitológico de fezes (EPF) em puérperas dos grupos I (n = 36) e II (n = 54).

EPF	Grupo I n (%)	Grupo II n (%)
Negativo	31 (86,1)	48 (88,9)
<i>S. stercoralis</i>	4 (11,1)	0
Ancilostomídeos	1 (2,8)	2 (3,7)
<i>Taenia</i> sp	0	1 (1,85)
<i>Enterobius vermicularis</i>	0	1 (1,85)
<i>Giardia lamblia</i>	0	1 (1,85)
<i>Hymenolepis nana</i>	0	1 (1,85)
TOTAL	36 (100)	54 (100)

4.3. Diagnóstico imunológico

4.3.1. Detecção de anticorpos específicos pela RIFI

A IgA específica anti-*S. stercoralis* foi detectada em 15 amostras de soro (16,7%) e 26 amostras de leite (28,9%) do total de puérperas. A positividade foi significativamente maior no grupo I com 15 (41,7%) amostras de soro e 23 (63,9%) amostras de leite positivas em comparação ao grupo II que apresentou nenhuma amostra de soro e apenas 3 (5,5%) amostras de leite positivas ($p < 0,0001$) (Tabela 3). No grupo I, os títulos de anticorpos IgA específicos foram 10 (30,6%) e 20 (11,1%) para as amostras de soro e 2 (41,7%), 4 (19,4%) e 8 (2,8%) para as amostras de leite (Tabela 4).

A figura 1 apresenta um teste positivo de imunofluorescência indireta de uma puérpera do grupo I para detecção de IgA específica anti-*S. stercoralis* no leite humano na diluição 1:2.

A IgG específica anti-*S. stercoralis* foi detectada em 37 amostras de soro (41,1%) e 23 amostras de leite (25,5%) do total de puérperas. A positividade foi maior no grupo I com 34 (94,4%) amostras de soro e 23 (63,9%) amostras de leite positivas em comparação ao grupo II, que apresentou apenas 3 (5,5%) amostras de soro e nenhuma amostra de leite positiva. A diferença entre os dois grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) (Tabela 3). No grupo I, os títulos de anticorpos IgG específicos foram 20 (44,4%), 40 (30,6%) e 80 (19,4%) para as amostras de soro e 4 (27,8%) e 8 (36,1%) para as amostras de leite (Tabela 4).

Tabela 3. Número absoluto e relativo de amostras de soro e leite apresentando anticorpos específicos IgA e IgG anti-*S. stercoralis* pelo teste de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em puérperas dos grupos I (n = 36) e II (n = 54).

	Grupo I		Grupo II	
	Soro	Leite	Soro	Leite
RIFI	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
IgA	15 (41,7)	23 (63,9) ^a	0	3 (5,5) ^b
IgG	34 (94,4) ^c	23 (63,9)	3 (5,5) ^d	0

a, b - $p < 0,0001$

c, d - $p < 0,0001$

Tabela 4. Distribuição dos títulos de anticorpos específicos IgA e IgG anti-*S. stercoralis* detectados pelo teste de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em amostras de soro e leite em puérperas dos grupos I (n = 36) e II (n = 54).

Título	Grupo I n (%)	Grupo II n (%)
Soro - IgA		
<10	21 (58,3)	54 (100)
10	11 (30,6)	0
20	4 (11,1)	0
Soro - IgG		
<20	2 (5,6)	51 (94,4)
20	16 (44,4)	3 (5,6)
40	11 (30,6)	0
80	7 (19,4)	0
Leite - IgA		
<2	13 (36,1)	51 (94,4)
2	15 (41,7)	3 (5,6)
4	7 (19,4)	0
8	1 (2,8)	0
Leite - IgG		
<4	13 (36,1)	54 (100)
4	10 (27,8)	0
8	13 (36,1)	0

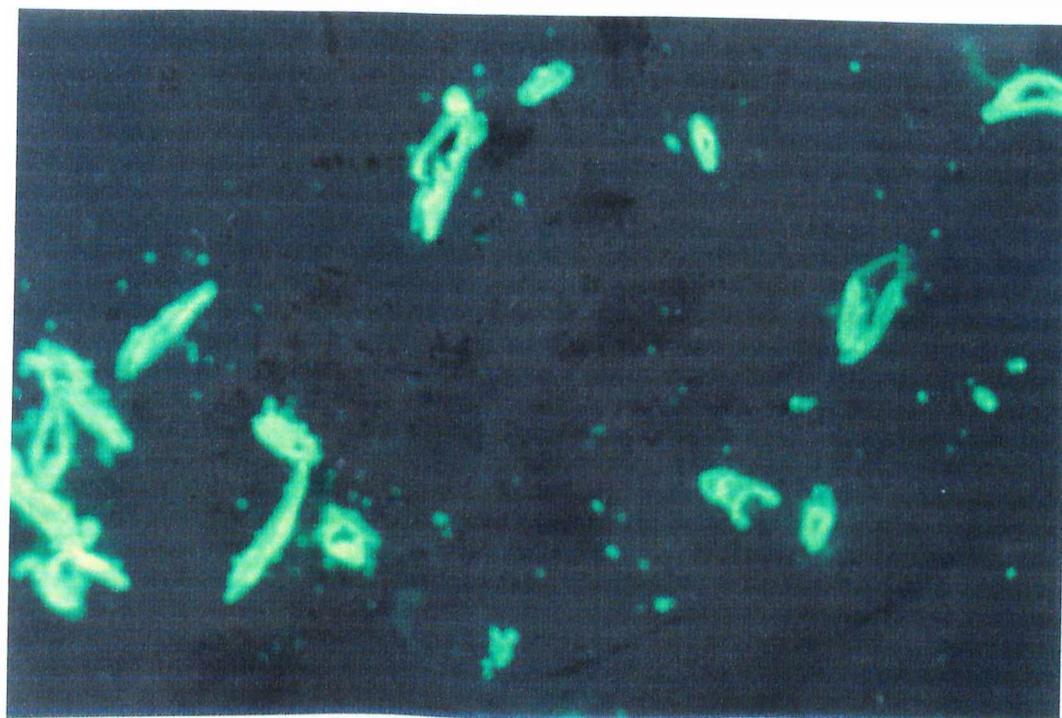


Figura 1. Reação de Imunofluorescência Indireta positiva utilizando cortes de larvas filarióides de *S. stercoralis* para detecção de IgA específica em amostra de leite humano (200x).

4.3.2. Detecção de anticorpos específicos pelo ELISA

No grupo I, as médias geométricas das concentrações de IgA específica anti-*S. stercoralis* no soro e leite, expressas em índice ELISA (IE) foram de 0,9 (IC 95%: 0,9 – 1,2) e 1,1 (IC 95%: 1,0 – 1,4), respectivamente. No grupo II, as médias geométricas das concentrações de IgA específica foram de 0,6 IE (IC 95%: 0,6-0,7 IE) no soro e 0,7 IE (IC 95%: 0,7-0,9 IE) no leite. Comparando-se os grupos I e II houve diferença estatisticamente significativa nos valores obtidos para o soro e leite ($p < 0,0001$) (Figura 2A).

As médias geométricas das concentrações de IgG específica no grupo I foram de 1,9 IE no soro (IC 95%: 1,8 – 2,4 IE) e de 0,8 IE no leite (IC 95%: 0,8 – 1,5 IE). Houve diferença estatística significativa em relação ao grupo II que apresentou concentrações menores de IgG específica anti-*S. stercoralis* tanto no soro (0,7 IE; IC 95%: 0,6-0,7 IE) quanto no leite (0,4 IE; IC 95%: 0,4-0,5 IE) ($p < 0,0001$) (Figura 2B).

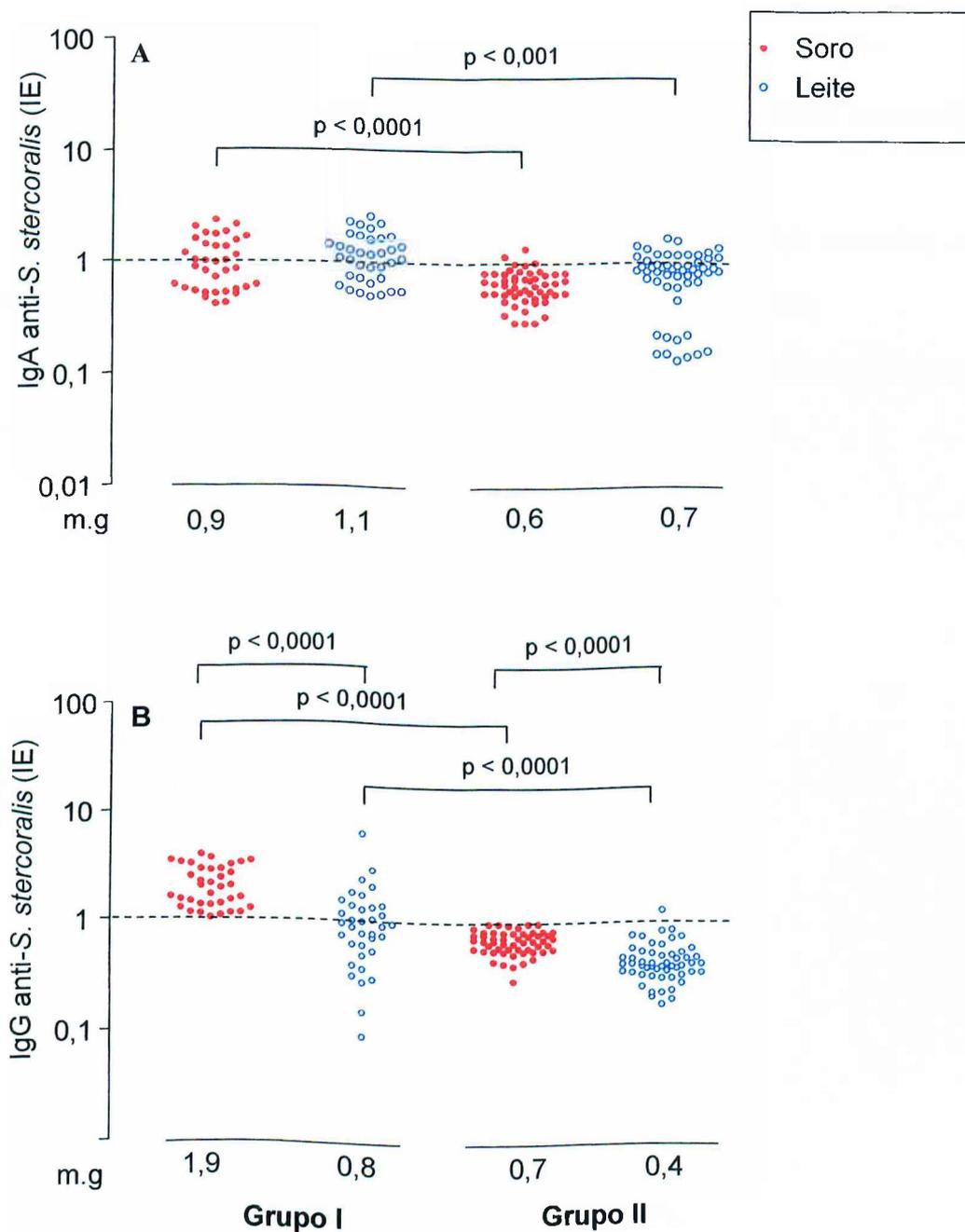


Figura 2. Níveis de IgA (A) e IgG (B) específicas anti-*S. stercoralis* determinados por ELISA e expressos em Índice ELISA (IE) em amostras de soro e leite de puérperas dos grupos I (n=36) e II (n=54). m.g: média geométrica. A linha tracejada indica o limiar de positividade dos testes (IE > 1).

4.3.3. Correlação de anticorpos específicos em amostras de soro e leite

Os dados de correlação positiva indicam a associação dos resultados encontrados no soro e no leite.

O grupo I apresentou correlação positiva entre os níveis de IgA específica anti-*S. stercoralis* nas amostras de soro e leite ($r = 0,5513$) ($p < 0,001$) (Figura 3A).

Não foi observado correlação positiva entre os níveis de IgG específica anti-*S. stercoralis* nas amostras de soro e leite ($r = 0,2968$) ($p > 0,05$) (Figura 3B).

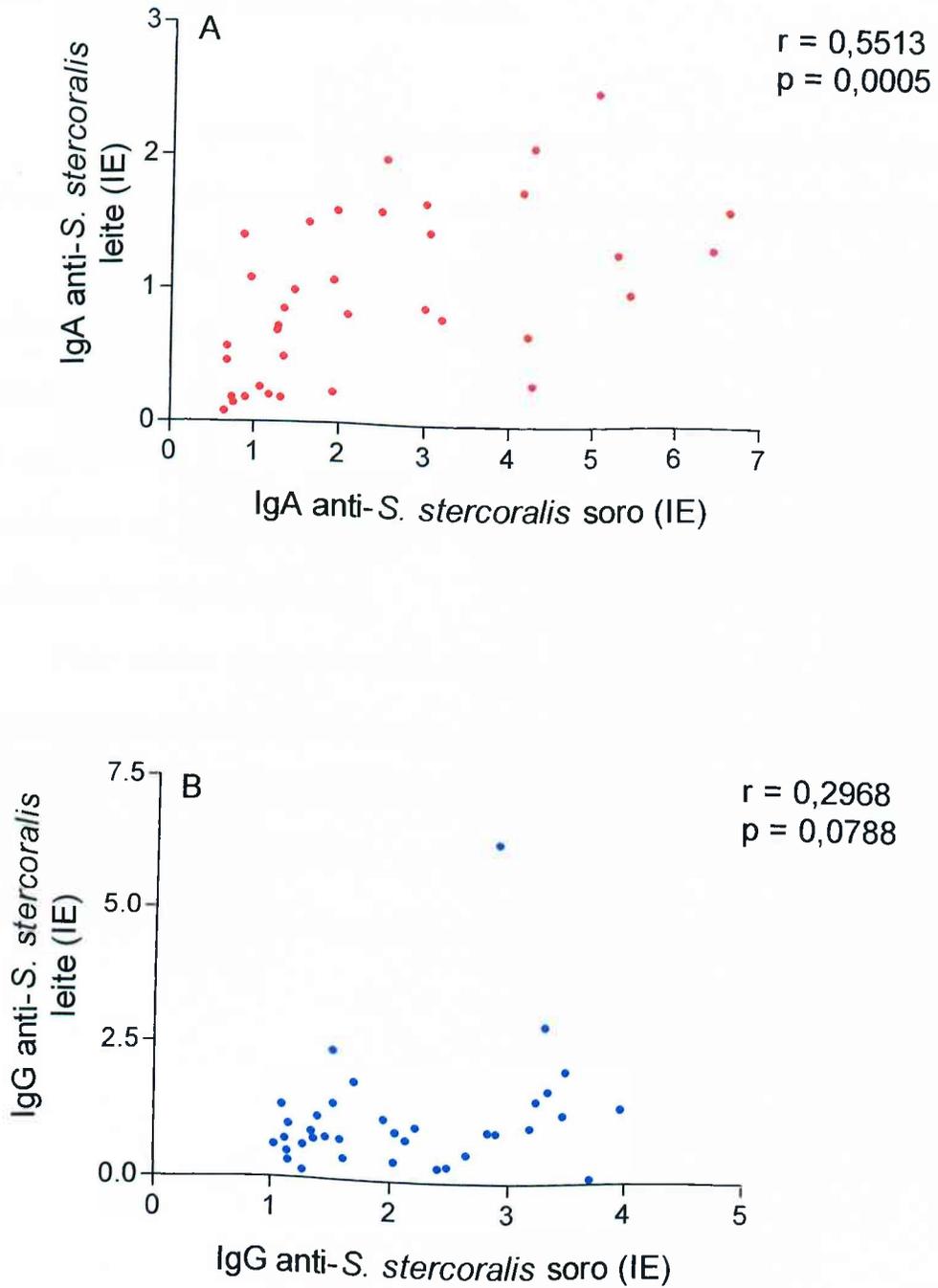


Figura 3. Correlação dos níveis de IgA (A) e IgG (B) específicas anti-*S. stercoralis*, expressos em Índice ELISA (IE) entre amostras de soro e leite de puérperas do grupo I (n=36). Correlação de Pearson.

4.3.4. Concordância dos testes RIFI e ELISA

A figura 4 apresenta a positividade dos testes RIFI e ELISA para detecção de IgA e IgG específicas anti-*S. stercoralis* em amostras de soro e leite das parturientes do grupo I.

Os resultados dos testes para detecção de IgA específica foram concordantes em 31 amostras de soro (86,1%) e discordantes em 5 amostras de soro (13,9%) com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Para detecção de IgG específica anti-*S. stercoralis* os resultados dos dois testes foram concordantes em 34 amostras de soro (94,4%) e discordantes em 2 amostras de soro (5,6%) também com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) (Tabela 5).

Neste mesmo grupo, considerando-se o leite, os dois testes imunológicos para detecção de IgA específica foram concordantes em 25 amostras (69,4%) e discordantes em 11 (30,6%) ($p < 0,001$). Para detecção de IgG específica os testes foram concordantes em 19 amostras (52,8%) e discordantes em 17 amostras (47,2%), não havendo diferença estatisticamente significativa entre estes resultados ($p > 0,05$) (Tabela 5).

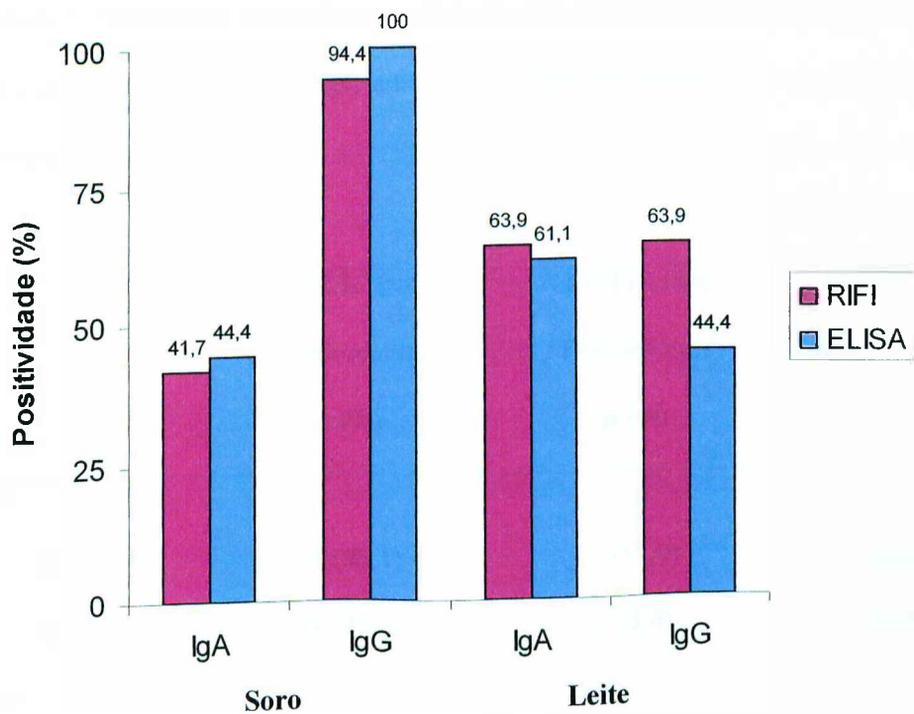


Figura 4. Positividade dos testes RIFI e ELISA, expressa em percentagem, na detecção de anticorpos específicos IgA e IgG anti-*S. stercoralis* em amostras de soro e leite de puerperas do grupo I (n = 36).

Tabela 5. Resultados concordantes e discordantes dos testes RIFI e ELISA para detecção de anticorpos específicos IgA e IgG anti-*S. stercoralis* em amostras de soro e leite humano em puérperas do grupo I (n=36).

	RIFI/ELISA Concordantes n (%)	RIFI/ELISA Discordantes n (%)	p
Soro			
IgA	31 (86,1)	5 (13,9)	< 0,0001
IgG	34 (94,4)	2 (5,6)	< 0,0001
Leite			
IgA	25 (69,4)	11 (30,6)	< 0,001
IgG	19 (52,8)	17 (47,2)	> 0,05

5. DISCUSSÃO

A prevalência das enteroparasitoses, incluindo a estrogiloidíase, constitui um sério problema de saúde nos países em desenvolvimento (SIDDIQUI; BERK, 2003). A facilidade de transmissão desta parasitose, o caráter de cronicidade e auto-infecção, originando formas graves de hiperinfecção e disseminação, além da possibilidade de reagudização em indivíduos imunodeprimidos, evoluindo muitas vezes para o óbito, fazem dela um importante problema médico e social (COSTA-CRUZ, 2000; FERREIRA; COSTA-CRUZ, 2003, SÁNCHEZ et al., 2001).

No Brasil, assim como em outros países tropicais a doença atinge todas as idades, com maior prevalência em crianças, tanto nas áreas urbanas como rurais. Nestas regiões, as condições climáticas favoráveis, população de baixo nível sócio-econômico com precárias condições de higiene, deficiências de saneamento básico e de educação sanitária possibilitam o desenvolvimento desta parasitose, contribuindo com as maiores prevalências já registradas. Os índices de ocorrência menores que 1%, de 1 a 5% e maiores que 5% definem, respectivamente, regiões de distribuição geográfica esporádica, endêmica e hiperendêmica da estrogiloidíase (FERREIRA; COSTA-CRUZ, 2003). Em nossa região estudos realizados demonstram prevalência variando de 3,3% a 13% em crianças (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998; PAULA et al., 2000) e 2,4% em gestantes (SANTOS et al., 1998).

O presente estudo encontrou prevalência de *S. stercoralis* de 4,4% em puérperas através do exame parasitológico de fezes, colaborando para as evidências de uma área com distribuição endêmica da estrogiloidíase.

Apesar do método de Baermann-Moraes ser descrito como de maior sensibilidade para o diagnóstico parasitológico da estrogiloidíase (HERNÁNDEZ-CHAVARRÍA;

AVENDAÑO, 2001), no presente estudo o parasito foi demonstrado em todos os casos pelo método de Hoffmann, Pons e Janer.

Pelas dificuldades do diagnóstico parasitológico da infecção por *S. stercoralis* em amostras de fezes, decorrentes da liberação larval pequena e irregular, tem-se investido em pesquisas para avaliação de métodos imunológicos de diagnóstico utilizando-se amostras de soro. Os testes imunológicos, principalmente, RIFI, ELISA e mais recentemente “Western Blotting” para detecção de IgG específica no soro têm sido muito utilizados e descritos como de elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da infecção pelo *S. stercoralis*, entretanto, encontram-se disponíveis apenas em centros especializados (BRASIL et al., 1988; CAMPOS et al., 1988; COSTA-CRUZ et al., 1997; COSTA-CRUZ; MACHADO; CAMPOS, 1998; COSTA-CRUZ et al., 1999; GENTA et al., 1988; MACHADO et al., 2001; MERCADO et al., 2002; MACHADO et al., 2003; SILVA et al., 2003).

Os pesquisadores têm também investigado fluidos orgânicos alternativos que poderiam ser utilizados para o diagnóstico imunológico desta parasitose sendo demonstrado que a RIFI pode ser utilizada para detecção de IgA específica anti-*Strongyloides* na saliva (COSTA et al., 2003). Estes testes imunológicos podem apresentar reação cruzada com outros helmintos, principalmente, *Schistosoma mansoni*, *Ascaris lumbricoides* e *Wuchereria bancrofti* (SIDDIQUI; BERK, 2003). É importante ainda ressaltar que do ponto de vista clínico os resultados dos testes imunológicos para detecção, principalmente, de IgG mas também de IgA específica anti-*S. stercoralis* requerem muita cautela na sua interpretação uma vez que um exame positivo indica infecção pelo parasita mas não se pode afirmar se esta infecção é atual ou prévia, sendo necessário a correlação clínico-laboratorial para a decisão com relação ao tratamento (SIDDIQUI; BERK, 2003).

No presente estudo, apesar das considerações sobre a superioridade do exame parasitológico para diagnóstico de certeza da estrogiloidíase, pela sua baixa sensibilidade, foi

utilizado o teste ELISA para o diagnóstico imunológico da infecção e as puérperas foram divididas em dois grupos de acordo com a detecção de anticorpos IgG específicos no soro. A positividade do teste (grupo I) foi considerada como indicativa de infecção anterior pelo parasito que poderia ou não estar ainda presente. Com relação à reatividade cruzada do teste, os parasitos descritos como de maior importância na reatividade não foram encontrados nos exames parasitológicos de fezes e, além disso, a região estudada não é endêmica para a esquistossomose e a filariose.

Devido à imaturidade do sistema imune, o recém-nascido é mais vulnerável às infecções, sendo fundamental a proteção conferida pela amamentação. A alimentação exclusiva com leite materno nos primeiros seis meses de vida é reconhecidamente a melhor forma de proteger o lactente das enfermidades infecciosas, sobretudo as intestinais (FIELD, 2005; MORROW; RANGEL, 2004; VIEIRA; SILVA; VIEIRA, 2003). Considerando as parasitoses intestinais, Costa-Macedo e Rey (2000) encontraram diferenças na prevalência em crianças relacionadas à amamentação sendo que nenhuma criança alimentada exclusivamente com leite materno apresentou infecção parasitária intestinal.

A glândula mamária da lactante faz parte de um sistema imune integrado responsável pela produção local de anticorpos, principalmente IgA secretora. Estes anticorpos refletem o estímulo antigênico da mucosa associada ao tecido linfóide pelos patógenos intestinais e respiratórios. Os anticorpos encontrados no leite materno são altamente específicos contra os agentes infecciosos do organismo materno com os quais o recém-nascido entrará em contato logo após o nascimento. Dessa forma, o aleitamento materno representa uma integração imunológica da mãe e sua criança. A mucosa constitui a porta de entrada da grande maioria dos agentes infecciosos e o período neonatal é particularmente crítico. Os patógenos da mucosa são fatores importantes de mortalidade em crianças menores de 5 anos determinando mais de 14 milhões de mortes por ano, sendo as infecções intestinais responsáveis por 5

milhões de crianças mortas anualmente nos países em desenvolvimento. (BRANDTZAEG, 2003; HANSON; KOROTKOVA, 2002; VAN de PERRE, 2003).

A IgA secretora presente no leite humano tem como principal ação a ligação a microrganismos e macromoléculas, impedindo sua aderência às superfícies mucosas, assim prevenindo o contato de patógenos com o epitélio. Outros mecanismos de ação da IgA envolvem a neutralização das toxinas liberadas por patógenos e a prevenção da translocação bacteriana através da barreira epitelial, o que protege o recém-nascido contra as infecções. Nesta ação protetora, outro mecanismo que pode estar envolvido é a presença de fatores de crescimento no leite humano. A IgA não tem atividade de opsonização, mas pode induzir a fagocitose pelos neutrófilos. Descreve-se ainda uma ação sinérgica entre IgA, lisozima e complemento (CRUZ; CANO; CACERES, 1991; GRASSI; COSTA; COSTA-VAZ, 2001; XANTHOU, 1998).

O efeito de proteção da mucosa intestinal do recém-nascido contra a aderência bacteriana pela IgA secretora tem sido demonstrado em estudos “in vitro” que avaliaram a adesão de *Escherichia coli* enteropatogênica às células epiteliais humanas em cultura na presença de colostro. Estes trabalhos detectaram também IgA específica contra os principais fatores de virulência desta bactéria no colostro (PALMEIRA et al., 2005; FERNANDES et al., 2001; LOUREIRO et al., 1998). Vários estudos têm sido realizados sugerindo e comprovando a proteção conferida pela IgA secretora específica presente no leite materno dirigida contra outras bactérias como *Vibrio cholerae*, *Salmonella* sp e *Shigella* sp, contra vários tipos de vírus como *Polio* I, II e III, rotavírus, contra protozoários como *Giardia lamblia* e ainda contra outros nematódeos como *Schistosoma mansoni* (ATTALAH et al., 2003; GRASSI; COSTA; COSTA-VAZ, 2001; HANSON; KOROTKOVA, 2002; MIOTTI et al., 1985; MORROW; RANGEL, 2004; VAN de PERRE, 2003).

Até o momento, entretanto, não há relatos na literatura de estudos investigando a presença de anticorpos no leite materno específicos contra *S. stercoralis*.

No presente estudo, as pacientes do grupo I consideradas como portadoras de infecção prévia por *S. stercoralis* apresentaram positividade elevada de IgA específica no leite, analisando-se os dois testes imunológicos utilizados, principalmente, o teste de RIFI. Costa et al. (2003) encontraram também positividade elevada de IgA específica pelo método RIFI mas em amostras de saliva.

A IgG específica anti-*S. stercoralis*, foi também demonstrada no leite nas pacientes do grupo I, principalmente pelo teste RIFI.

Estes achados sugerem que em áreas endêmicas as crianças podem adquirir anticorpos específicos contra o parasito *S. stercoralis* de suas mães através da amamentação.

Pesquisas realizadas sobre o papel da IgA na imunidade de mucosa e sistêmica, correlacionam a sua presença no soro e nas secreções (CONLEY; DELACROIX, 1987). Os achados apontam para uma aparente compartimentalização dos sistemas de mucosa e sérico. O transporte da IgA sérica para as secreções não concorre para sua eliminação do soro, sendo a maior fonte de IgA vascular proveniente da medula óssea, contrastando com a IgA de secreção cuja fonte principal é o tecido linfóide associado às mucosas. (MESTECKY et al., 1986; CONLEY; DELACROIX, 1987). As concentrações de IgA específica anti- *S. stercoralis* observadas no soro apresentaram correlação positiva com as concentrações de IgA encontradas no leite das puérperas do grupo I. Tal correlação não foi observada com as concentrações de IgG específica no soro e no leite. Estudo anterior realizado por Costa et al. (2003) mostrou correlação positiva das concentrações de IgA específica anti-*S. stercoralis* no soro e na saliva e da mesma forma não observou correlação entre as concentrações de IgG específica nestas mesmas amostras.

Analisando os resultados dos dois métodos imunológicos utilizados para detecção dos anticorpos específicos anti-*S. stercoralis*, houve um alto grau de concordância entre eles para a detecção de IgA e IgG no soro e para detecção de IgA no leite. Todavia, a detecção de IgG no soro mostrou uma positividade maior para a detecção de anticorpos, independente do teste utilizado. Costa et al. (2003) demonstraram maiores valores de positividade para detecção de IgG específica anti-*S. stercoralis* em amostras de soro pelo ELISA .

Não foi observado concordância na detecção de anticorpos específicos IgG no leite pelos dois métodos imunológicos avaliados. A detecção de anticorpos IgG específicos no leite era de se esperar que fosse menor que a observada no soro conforme resultado dos dois testes. Entretanto, o teste RIFI não foi concordante com o ELISA e apresentou maior positividade para detecção de IgG específica no leite podendo-se pensar em um grande número de resultados falso-positivos. Todavia, comparando-se os resultados do teste RIFI nos dois grupos de puérperas estudadas não foi detectado positividade em qualquer caso do grupo II.

Os anticorpos específicos encontrados no leite materno refletem eventos imunológicos que ocorreram na mucosa intestinal materna previamente, em resposta a estímulos antigênicos. Dessa forma, o leite humano é ideal para os estudos de imunidade protetora, a nível de mucosa, além de poder ser utilizado como uma ferramenta no auxílio diagnóstico, principalmente, epidemiológico, pois os anticorpos específicos encontrados refletem infecções maternas anteriores (NOGUERA-OBENZA et al., 2003; NATHAVITHARANA; CATTY; McNEISH, 1994).

A demonstração dos anticorpos específicos IgA e IgG dirigidos contra *S. stercoralis* no leite materno no presente estudo sugere que em áreas endêmicas, como a região estudada, as crianças podem adquirir estes anticorpos através da amamentação contribuindo para a imunidade específica da mucosa intestinal contra este parasito. Além disso, o leite materno

pode ser utilizado como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico da estrogiloidíase, sobretudo no diagnóstico epidemiológico.

6. CONCLUSÕES

- Foi possível detectar anticorpos específicos IgA e IgG anti-*S. stercoralis* em amostras de soro e leite de puérperas utilizando-se dos testes imunológicos RIFI e ELISA.
- Os testes RIFI e ELISA mostraram-se concordantes na detecção dos anticorpos específicos IgA anti- *S. stercoralis* no soro e no leite e na detecção de anticorpos específicos IgG no soro.
- A demonstração dos anticorpos específicos IgA e IgG dirigidos contra *S. stercoralis* no leite materno sugere que em áreas endêmicas as crianças podem adquirir estes anticorpos através da amamentação contribuindo para a imunidade específica da mucosa intestinal contra este parasito.
- Considerando as dificuldades do diagnóstico parasitológico da infecção por *S. stercoralis*, o leite humano pode ser utilizado como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico da estrogiloidíase, sobretudo no diagnóstico epidemiológico.

7. RESUMO

A estrogiloidíase é uma das principais doenças parasitárias humanas, resultante da infecção intestinal pelo *S. stercoralis*. A amamentação pode conferir uma proteção em potencial contra esta infecção. O objetivo do estudo foi detectar anticorpos específicos IgA e IgG anti-*S. stercoralis* em amostras de soro e leite de 90 puérperas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia utilizando-se dos testes de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA). As pacientes foram divididas em dois grupos de acordo com a detecção de anticorpos específicos IgG contra *S. stercoralis* pelo ELISA em amostras de soro: grupo I – IgG específica positiva (n=36) e grupo II – IgG específica negativa (n=54). Comparando-se os dois grupos a positividade para detecção de IgA e IgG específicas anti-*S. stercoralis* foi significativamente maior no grupo I. Para as amostras de soro a positividade para detecção de IgA específica no grupo I foi de 41,7% pelo método RIFI e 44,4% pelo ELISA com uma concordância de 86,1% entre os dois testes ($p < 0,0001$). Neste mesmo grupo, a positividade para detecção de IgA específica nas amostras de leite foi 63,9% pelo método RIFI e 61,1% pelo ELISA com uma concordância de 69,4% ($p < 0,001$). Considerando-se a detecção de IgG específica no grupo I a positividade nas amostras de soro foi de 94,4% pelo RIFI e 100% pelo ELISA com uma concordância de 94,4% ($p < 0,0001$) e nas amostras de leite foi de 63,9% pelo RIFI e 44,4% pelo ELISA com uma concordância de apenas 52,8% ($p > 0,05$). Foram então detectados anticorpos específicos IgA e IgG em amostras de soro e leite pelos métodos RIFI e ELISA e os dois testes mostraram-se concordantes para detecção de IgA no soro e leite e IgG no soro.

Palavras-chave: Estrogiloidíase, IgA, IgG, amamentação, imunodiagnóstico.

8. ABSTRACT

Strongyloidiasis, caused by the nematode *Strongyloides stercoralis*, is one of the major parasite infections in humans, distributed worldwide, with difficulties in diagnosis. Breastfeeding may offer a potential protection against the infection. The objective of the study was to detect specific *S. stercoralis* IgA and IgG antibodies in serum and breast milk samples of 90 lactating women from Clinics Hospital of Federal University of Uberlândia using indirect fluorescent antibody test (IFAT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Subjects were divided in two groups according to the detection of specific *S. stercoralis* IgG antibody by ELISA in serum samples: group I – positive specific IgG antibody (n = 36); group II – negative specific IgG antibody (n = 54). Comparing both groups positivity was greater in group I to detect specific *S. stercoralis* IgA and IgG antibodies using both immunological methods. Positivity for specific IgA antibody in group I was 41.7% by IFAT and 44.4% by ELISA in serum samples with a concurrence of 86.1% ($P < 0.0001$). In breast milk samples positivity for specific IgA antibody was 63.9% using IFAT and 61.1% using ELISA with a concurrence of 69.4% ($P < 0.001$). Considering the detection of specific IgG antibody in group I, positivity in serum samples was 94.4% in IFAT and 100% in ELISA with a concurrence of 94.4% ($P < 0.0001$). In breast milk samples positivity for specific IgG antibody was 63.9% in IFAT and 44.4% in ELISA with a concurrence of 52.8% ($P > 0.05$). Specific *S. stercoralis* IgA and IgG antibodies were detected in serum and breast milk samples using IFAT and ELISA and both tests showed concordance in detecting specific IgA antibody in serum and breast milk samples and in detecting specific IgG antibody in serum samples.

Key words: strongyloidiasis, IgA, IgG, breastfeeding, immunodiagnosis

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ²

- ADDERSON, E. E.; JOHNSTON J. M.; SHACKERFORD, P. G.; CARROLL W. L. Development of the human antibody repertoire. **Pediatric Research**, v. 32, p. 257-263, 1992.
- ANDRADE NETO, J. L.; ASSEF, M. C. V. Estrongiloidíase. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996, p. 1373-1378.
- ATTALLAH, A. M.; GHANEM, G. E.; ISMAIL, H.; WASEEF, A. M. Placental and oral delivery of *Schistosoma mansoni* antigen from infected mothers to their newborns and children. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, p. 647-651, 2003.
- BAERMANN, G. Eine einfache methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) – larven in Erdproben. Mededeel Geneesk. Batavia: **Laboratories Weltevreden Feestbundel**, p. 41-47, 1917.
- BASSI G. E.; ISHIKI, D. K.; FERREIRA, A. W.; CAMARGO, M. E. A reação imunoenzimática para cisticercose no líquido cefalorraquiano – considerações sobre o limiar de reatividade. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 27, p. 49-52, 1991.
- BENHUR JUNIOR, A.; SERUFO, J. C.; LAMBERTUCCI, J. R. Pulmonary strongyloidiasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.37, p.359-360, 2004.
- BORDA, C. E. Intestinal parasitism in San Cayetano, Corrientes, Argentina. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 30, n. 3, p. 227-233, 1996.
- BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. **Vaccine**, v. 21, p. 3382-3388, 2003.
- BRASIL, R.; BADARÓ, R.; ANDRADE, J. A. F. Diagnóstico sorológico da estrongiloidíase humana pelo método imunoenzimático ELISA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, p. 139-143, 1988.
- CALVANO, L. M. O poder imunológico do leite materno. In: CARVALHO, M. R.; TAMEZ, R. N. **Amamentação: bases científicas para a prática profissional**. Guanabara Koogan, 2002. p. 88-95.

² Referências de acordo com a NBR-6023/2002 da Associação Brasileira de Normas e Técnicas. Comissão de Estudos de Documentação, Rio de Janeiro.

- CAMPOS, D. M. B.; OLIVEIRA, O. S.; BARBOSA, W.; CAMPOS, M. L. L.; ROSA, Z. S.; SOUZA, O.C. Antígeno de *Strongyloides cebus* (Darling, 1911) no diagnóstico da estrogiloidíase humana. **Revista de Patologia Tropical**, v. 17, p. 17-23, 1988.
- CARVALHO, B. T. C.; NUDELMAN, V.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Mecanismos de defesa contra infecções. **Jornal de Pediatria**, v. 74, Supl. 1, p. S3-S11, 1998.
- CHAVES-BORGES, F. A.; MINEO, J. R. **Medidas de biossegurança em laboratórios**. Uberlândia: Gráfica da Universidade Federal de Uberlândia, 1997, 55p.
- CLEARY, T. G. Human milk protective mechanisms. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 554, p. 145-154, 2004.
- CONLEY, M. E.; DELACROIX, D. L. Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but relative systems of immune defense? **Annals of the International Medicine**, v. 106, p. 892-899, 1987.
- COSTA, I. N.; SOPELETE, M. C.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; COSTA-CRUZ, J. M. IgA and IgG antibodies in paired serum and saliva samples in human strongyloidiasis. **Acta Parasitologica**, v. 48, p. 306-311, 2003.
- COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis*. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia humana**. 10 ed. Atheneu, 2000. p. 247-256.
- 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). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, p. 329-331, 1998.
- COSTA-CRUZ, J. M.; BULLAMAH, C. B.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; CAMPOS, D. M. B.; VIEIRA, M. A. Cryo-microtome sections 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.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; PAULA, F. M.; CAMPOS, D. M. B. Padronização do teste ELISA para a detecção de anticorpos IgM, utilizando extrato salino e alcalino de *Strongyloides ratti* no diagnóstico da estrogiloidíase humana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32 (suplemento 1), p. 299, 1999.

COSTA-MACEDO, L.; REY, L. Maternal and child intestinal parasitism and breastfeeding. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 371-375, 2000.

CRUZ, J. R.; CANO, F.; CACERES, P. Association of human milk S-IgA antibodies with maternal intestinal exposure to microbial antigens. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 310, p. 193-199, 1991.

DADA-ADEGBOLA, H. O.; BAKARE, R. A. Strongyloidiasis in children five years and below. **West African Journal of Medicine**, v. 23, p. 194-197, 2004.

D'ALAURO, F.; LEE, R. V.; PAO-IN, K.; KHAIRALLAH, M. Intestinal parasites and pregnancy. **Obstetrics & Gynecology**, v. 66, p. 639-643, 1985.

FERNANDES, R. M.; CARBONARE, S. B.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M.; TRABULSI, L. R. Inhibition of enteroagregative *Escherichia coli* adhesion to HEp-2 cells by secretory immunoglobulin A from human colostrum. **Pediatric Infectious Diseases Journal**, v. 20, p. 672-678, 2001.

FERREIRA, M. S. Estrongiloidíase. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R.; DIETZE, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8 ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1991. p. 856-864.

FERREIRA, M. S. Strongyloidiasis and acquired immunodeficiency syndrome. **Enfermedades Emergentes**, v. 5, p. 18-26, 2003.

FERREIRA, M. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Estrongiloidíase. In: CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. **Medicina Tropical**. Atheneu, 2003. p. 241-251.

FERREIRA, M. S.; NISHIOKA, S. A.; BORGES, A. S.; COSTA-CRUZ, J. M.; ROSSIN, I. R.; ROCHA, A.; SILVESTRE, M. T. A.; NUNES ARAUJO, F. R. F. Strongyloidiasis and infection due to human immunodeficiency virus: 25 cases at a Brazilian Teaching Hospital, including seven cases of hyperinfection syndrome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 1, p. 154-155, 1999.

FIELD, C. J. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. **The Journal of Nutrition**, v. 135, p. 1-4, 2005.

GENTA, R. M. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into the prevention of disseminated disease. **Reviews in Infectious Diseases**, v. 11, p. 755-767, 1989.

GENTA, R. M.; GATTI, S.; LINKE, M. J.; CEVINI, C.; SCAGLIA, M. Endemic strongyloidiasis in northern Italy: clinical and immunological aspects. **Quarterly Journal of Medicine**, v. 28, p. 679-690, 1988.

GOLDMAN, A. S. The immune system of human milk: antimicrobial, anti-inflammatory and immunomodulating properties. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 12, p. 664-672, 1993.

GOLDMAN, A. S.; THORPE, L. W.; GOLDBLUM, R. M.; HANSON, L. A. Antiinflammatory properties of human milk. **Acta Paediatrica Scandinavica**, v. 75, p. 689-695, 1986.

GOLDMAN, A. S.; CHEDA, S.; KEENEY, S.; SCHMALSTIEG, F. C.; SCHANLER, R. J. Immunologic protection of the premature newborn by human milk. **Seminars in Perinatology**, v. 18, p. 495-501, 1994.

GRASSI, M. S.; COSTA, M. T. Z.; COSTA-VAZ, F. A. Fatores imunológicos do leite humano. **Pediatria São Paulo**, v. 23, p. 258-263, 2001.

GROVE, D.I. Human strongyloidiasis. **Advances in Parasitology**. v. 38, p. 251-309, 1996.

GROVE, D. I.; BLAIR, A. J. Diagnosis of human strongyloidiasis by immunofluorescence, using *Strongyloides ratti* and *S. stercoralis* larvae. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 344-349, 1981.

HAMOSH, M. Bioactive factors in human milk. **Pediatric Clinics of North America**, v. 48, p. 69-86, 2001.

HANSON, L. A.; KOROTKOVA, M. The role of breastfeeding in prevention of neonatal infection. **Seminars in Neonatology**, v. 7, p. 275-281, 2002.

HEATON, J.; SHIPPEY, S.; MACRI, C.; MACEDONIA, C. Intestinal helminthes infestation in pregnancy: a case report and literature review. **Military Medicine**, v. 167, p. 954-955, 2002.

HERNÁNDEZ-CHAVARRÍA, F.; AVENDAÑO, L. A simple modification of the Baermann method for diagnosis of strongyloidiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 805-807, 2001.

HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. Puerto Rico. **Journal of Public Health Tropical Medicine**, v. 9, p. 283-291, 1934.

KEISER, P. B.; NUTMAN, T. B. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 208-217, 2004.

KOOSHA, S.; FESHARAKI, M.; ROKNI, M. B. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis of human strongyloidiasis. **Indian Journal of Gastroenterology**, v. 23, p. 214-216, 2004.

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 immunoblot methods for the diagnosis of endemic *S. stercoralis* infection. **American Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, v. 51, p. 175-179, 1994.

LIU, L. X.; WELLER, P. F. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v. 37, p. 655-682, 1993.

LOUREIRO, I.; FRANKEL, G.; ADU-BOBIE, J.; DOUGAN, G.; TRABULSI, L. R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. Human colostrum contains IgA antibodies reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* virulence-associated proteins: intimin, BfpA, EspA and EspB. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 27, p. 166-171, 1998.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 29, p. 265-275, 1951.

MACEDO, L. M. C.; REY, L. Enteroparasitoses em gestantes e puérperas no Rio de Janeiro. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 12, p. 383-388, 1996.

MACEDO, L. M. C.; REY, L. Frequency and precocity of human intestinal parasitism in a group of infants from Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, p. 305-306, 1997.

MACEDO, L. M. C.; REY, L. Aleitamento e parasitismo intestinal materno-infantil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 371-375, 2000.

MACHADO, E. R.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 161-164, 1998.

- MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; OLIVEIRA, J. B. A.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulate antigen of two strains of *Strongyloides venezuelensis* in indirect immunofluorescence antibody test. **Experimental Parasitology**, v. 99, p. 52-55, 2001.
- MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; OLIVEIRA, J. B. A.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 849-851, 2003.
- MAHMOUD, A. A. F. Strongyloidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, p. 949-53, 1996.
- MERCADO, R.; JERCIC, M. I. L.; TORRES, P. H.; ALCAYAGA, S. U.; PAULA, F. M.; COSTA-CRUZ, J. M.; UETA, M. T. Immunodiagnóstico de las infecciones por *Strongyloides stercoralis* en Chile utilizando la prueba de ELISA. **Revista Médica de Chile**, v. 130, p. 1358-1364, 2002.
- MESTECKY, J.; RUSSEL, M. W.; JACKSON, S.; BROWN, T. A. The human IgA system: a reassessment. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 40, p. 105-114, 1986.
- MIOTTI, P. G.; GILMAN, R. H.; PICKERING, L. K.; RUIZ-PALACIOS, G.; PARK, H. S.; YOLKEN, R. H. Prevalence of serum and milk antibodies to *Giardia lamblia* in different populations of lactating women. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 152, p. 1025-1031, 1985.
- MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da strongiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, v. 1, p. 507-624, 1948.
- MORROW, A. L.; RANGEL, J. M. Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 15, p. 221-228, 2004.
- NAMISATO, S.; MOTOMURA, K.; HARANAGA, S.; HIRATA, T.; TOYAMA, M.; SHINZATO, T.; HIGA, F.; SAITO, A. Pulmonary strongyloidiasis in a patient receiving prednisolone therapy. **Internal Medicine**, v. 23, p. 194-197, 2004.
- NASCIMENTO, M. B. R.; ISSLER, H. Breastfeeding: making the difference in the development, health and nutrition of term and preterm newborns. **Revista do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 58, p. 49-60, 2003.

NATHAVITHARANA, K. A.; CATTY, D.; McNEISH, A. S. IgA antibodies in human milk: epidemiological markers of previous infections? **Archives of Disease in Childhood. Fetal Neonatal Edition**, v. 71, p. F192-197, 1994.

NEVA, F. A.; GAM, A. A.; MAXWELL, C.; PELLETIER, L. L. Skin test antigens for immediate hypersensitivity prepared for infective larvae of *Strongyloides stercoralis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 567-572, 2001.

NEVES, D. P. Meios de cultura. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia humana**. 10 ed. Atheneu, 2000. p. 412-415.

NOGUERA-OBENZA M.; OCHI T. J.; GOMEZ, H. F.; GUERRERO, M. L.; HERRERA-INCHUA, I.; MORROW, A. L.; RUIZ-PALACIOS, G.; PICKERING, L. K.; GUZMAN, C. A.; CLEARY, T. G. Human milk secretory antibodies against attaching and effacing *Escherichia coli* antigens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 545-551. 2003.

OLMOS, M. J.; GRACIA, S.; VILLORIA, F.; SALESA, R.; GONZALEZ-MACIAS, J. Disseminated strongyloidiasis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **European Journal of Internal Medicine**, v. 15, p. 529-530, 2004.

PALMEIRA, P.; CARBONARE, S. B.; AMARAL, J. A.; TINO-DE-FRANCO, M.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. Colostrum from healthy brazilian women inhibits adhesion and contains IgA antibodies reactive with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **European Journal of Pediatrics**, v. 164, p. 37-43, 2005.

PAULA, F. M.; CASTRO, E.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; MARÇAL, M. G.; CAMPOS, D. M. B.; COSTA-CRUZ, J. M. Parasitological and immunological diagnosis 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.

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

RAHIM, S.; DRABU, Y.; JARVIS, K.; MELVILLE, D. Strongyloidiasis: a mistaken diagnosis and a fatal outcome in a patient with diarrhoea. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, p. 215-217, 2005.

RAVI, V.; RAMACHANDRAN, S.; THOMPSON, R. W.; ANDERSEN, J. F.; NEVA, F. A. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 125, p. 73-81, 2002.

- REY, L. *Strongyloides stercoralis* e estrogiloidíase. In: _____. **Parasitologia**. 3 ed. Guanabara Koogan, 2001. p. 581-590.
- ROGNUM, T. O.; THRANE, S.; STOLTENBERG, L. Development of intestinal mucosal immunity in fetal life and the first postnatal months. **Pediatric Research**, v. 32, p. 145-149, 1992.
- ROSSI, C. L.; TAKAHASHI, E. E. H.; TEIXEIRA, A. L. S.; MAZON-BARROS, S.; TREVISAN, R. C. G. Avaliação de preparações antigênicas de *Strongyloides stercoralis* para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 26, p. 83-87, 1993.
- RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes: modificação do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolph Lutz**, v. 14, p. 14-18, 1954.
- SAFDAR, A.; MALATHUM, K.; RODRIGUEZ, S. J.; HUSNI, R.; ROLSTON, K. Strongyloidiasis in patients at a comprehensive cancer center in the United States. **Cancer**, v. 100, p. 1531-1536, 2004.
- SALAZAR, S. A.; GUTIERREZ, C.; BERK, S. L. Value of agar plate method for the diagnosis of intestinal strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 23, p. 141-145, 1995.
- SANCHEZ, P. R.; GUZMAN, A. P.; GUILLEN, S. M.; ADELL, R. I.; ESTRUCH, A. M.; GONZALEZ, I. N.; OLMOS, C. P. Endemic strongyloidiasis on the spanish mediterranean coast. **Quaternary Journal of Medicine**, v. 94, p. 357-363, 2001.
- SANTOS, M.C.; COSTA-CRUZ, J. M.; CARVALHO-NETO, C.; LIMA, M. M. R. Enteric parasites and commensals in pregnant women seen at the university hospital, Federal University of Uberlândia, state of Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 3, p. 69-71, 1998.
- SATO, Y. Efficacy of stool examination for detection of *Strongyloides* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, p. 248-250, 1995.
- SATO, Y.; TOMA, H.; KIYUNA, S.; SHIROMA, Y. Gelatin particule indirect agglutination test for examination for strongyloidiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 515-518, 1991.

SCHAEFFER, M. W.; BUELL, J. F.; GUPTA, M.; CONWAY, G. D.; AKHTER, S. A.; WAGONER, L. E. *Strongyloides* hyperinfection syndrome after heart transplantation: case report and review of the literature. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 23, p. 905-911, 2004.

SCHELONKA, R. L.; INFANTE, A. J. Neonatal immunology. **Seminars in Perinatology**, v. 22, p. 2-14, 1998.

SIDDIQUI, A. A.; BERK, S. L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 1040-1047, 2001.

SIDDIQUI, A. A.; BERK, S. L. Strongyloidiasis. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, v. 5, p. 283-289, 2003.

SILVA, L. P.; BARCELOS, I. S. C.; LIMA, A. B. P.; ESPINDOLA, F. S.; CAMPOS, D. M. B.; COSTA-CRUZ, J. M. Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 687-691, 2003.

SUDARSHI, S.; STUMPFLE, R.; ARMSTRONG, M.; ELLMAN, T.; PARTON, S.; KRISHNAN, P.; CHIODINI, P. L.; WHITTY, J. M. Clinical presentation and diagnostic sensitivity of laboratory tests for *Strongyloides stercoralis* in travelers compared with immigrants in a non-endemic country. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, p. 728-732, 2003.

TARANTO, N. J.; FILLIPPI, H.B.; ORIONE, O. Prevalencia de la infección por *Strongyloides stercoralis* en la primera infancia. Óran, Salta, Argentina. **Boletín Chileno Parasitology**, v. 48, p. 49-51, 1993.

UPARANUKRAW, P.; PHONGSRI, S.; MORAKOTE, N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. **American Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, v. 60, p. 967-973, 1999.

VAN de PERRE, P. Transfer of antibody via mother's milk. **Vaccine**, v. 21, p. 3374-3376, 2003.

VIEIRA, G. O.; SILVA, L. R.; VIEIRA, T. O. Alimentação infantil e morbidade por diarreia. **Jornal de Pediatria**, v. 79, p. 449-454, 2003.

VILLAR, J.; KLEBANOFF, M.; KESTLER, E. The effect on fetal growth of protozoan and helminthic infection during pregnancy. **Obstetrics & Gynecology**, v. 74, p. 915-920, 1989.

WILSON, C. B.; WESTFALL, J.; JOHNSON L. Decreased production of interferon-gamma by human neonatal cells: intrinsic and regulatory deficiencies. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 77, p. 860-867, 1986.

WOLD, A. E.; ADLERBERTH, I. Breast feeding and the intestinal microflora of the infant: implication against infections diseases. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 478, p. 77-93, 2000.

XANTHOU, M. Immune protection of human milk. **Biology of the Neonate**, v. 74, p. 121-133, 1998.

YACHIE, A.; TAKANO, N.; OHTA, K. Defective production of interleucin-6 in very small premature infants in response to bacterial pathogens. **Infection Immunity**, v. 60, p. 749-753, 1992.

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP 38400-089 - ☎ (034) 3231-8046 FONE/FAX (034) 239-4131

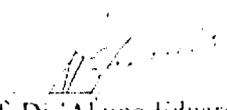
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 137/03

Uberlândia, 07 de outubro de 2003

Ilmo(a) Sr(a)
Prof(a) Dr(a) Júlia Maria Costa Cruz

Prezadota) Professora(a).

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia examinou e **APROVOU** o projeto de pesquisa "Diagnóstico Imunoparasitológico da Estrongiloidíase através de amostras pareadas de fezes, soro e de leite humano de puerperas" protocolado sob o número 91/2003, do qual V.Sa. figura como pesquisador responsável, para ser desenvolvido a partir desta data.


Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella
Coordenador do CEP UFU

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, RG _____,

concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado "DETECÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS IgA E IgG EM AMOSTRAS PAREADAS DE SORO E LEITE NA ESTRONGILOIDÍASE HUMANA" que será realizado no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, estando ciente dos seguintes aspectos:

- Os objetivos da pesquisa visam o diagnóstico da estrogiloidíase através da coleta de amostras de fezes, leite humano e soro.
- Terei a garantia de receber resposta a qualquer pergunta, ou esclarecimento a qualquer dúvida relacionada aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à investigação.
- Terei a garantia de recusar a participar ou até retirar meu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem qualquer penalização ou prejuízo no que se refere ao meu atendimento.
- Será respeitado o caráter confidencial das informações fornecidas, não sendo permitida a minha identificação.
- Serei informada dos resultados da coleta das amostras e, caso necessário, serei orientada quanto à necessidade de tratamento médico.

Assinatura da voluntária / data

Daniela Marques de Lima Mota Ferreira (Mestranda) / data

Profª Drª Julia Maria Costa Cruz (Professora de Parasitologia da UFU) / data

No caso de qualquer dúvida entrar em contato com a Profª Julia pelo telefone 3218-2187 ou no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia – Campus Umuarama.