



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

mon
616.995.132.2
C837d
TES/MEM

IDESSANIA NAZARETH DA COSTA

***DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGA E IGG ESPECÍFICOS EM
AMOSTRAS PAREADAS DE SORO E SALIVA 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.

UBERLÂNDIA – MG
2002

SISBI/UFU



1000204847



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

*DETECÇÃO DE ANTICORPOS IGA E IGG ESPECÍFICOS EM
AMOSTRAS PAREADAS DE SORO E SALIVA 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.

IDESSANIA NAZARETH DA COSTA

Profª Drª Julia Maria Costa Cruz
Orientadora

Uberlândia – MG
2002

Trabalho realizado no laboratório de Parasitologia da Área de Imunologia
Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade
Federal de Uberlândia, sob apoio financeiro da FAPEMIG e da CAPES.

"Não sejas o de hoje.
Não suspires por ontens...
Não queiras ser o de amanhã.
Faze-te sem limites no tempo.
Vê a tua vida em todas as origens.
Em todas as existências.
Em todas as mortes.
E sabe que serás assim para sempre.
Não queiras marcar a tua passagem.
Ela prossegue:
É a passagem que se continua.
É a tua eternidade...
É a eternidade.
És tu".

Cecília Meireles

“Qualquer homem pode tornar-se grande,
se realizar as coisas mais simples da vida,
animado de um forte e sincero desejo
de ser útil aos outros, seja qual for
a sua profissão”.

O. Herrera

DEDICO

A DEUS, Pai sublime de amor e bondade, por ter me concedido a benção da vida;

*Aos meus queridos pais, João e Nair, pelo apoio em todos os instantes;
Ao amado irmão Rislely, por pacientemente suportar minhas crises;*

Aos meus padrinhos, Vicente e Nazir, pelo incentivo e confiança no meu trabalho;

À todos que torceram, lutaram e que, de alguma forma, me acompanharam para e durante a realização deste trabalho.

Agradecimentos

Certa vez ouvi de uma pesquisadora, cujo trabalho acabara de ser premiado, a seguinte frase:

“Nessa profissão não se ganha muito dinheiro mas a gente se diverte...”

Essas palavras estarão sempre presentes na minha mente e confesso que somente hoje pude perceber o valor e representatividade das mesmas.

Pensando nisso é que a cada dia sei que só tenho a agradecer àqueles que “me proporcionam essa diversão”, seja na forma de ensinamentos com seus exemplos de vida ou pelos momentos de alegria.

Em especial agradeço:

À professora Dra Julia Maria Costa-Cruz, pela orientação concedida desde períodos anteriores ao mestrado, pelo profissionalismo e experiência.

*À professora Dra. Dulcinéa M. B. Campos, que cedeu as larvas de *S. ratti*.*

Aos professores Adriano M. Loyola, Foued S. Espindola e Márcia Cury, pela análise crítica do manuscrito para publicação cujas colocações foram altamente pertinentes.

À professora e amiga Márcia Cury pelos momentos de descontração.

À todos professores do curso da pós-graduação, por nos instruírem cientificamente.

À professora e amiga Mônica C. Sapelete, serei eternamente grata pelas horas de dedicação, pelo carinho e atenção a mim dispensados.

Ao professor Júlio Mendes pelo auxílio prestado com o computador, suportando meu “stress”.

À professora Ivanildes Solange Barcelos, pelo auxílio técnico.

À professora e doutoranda do programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Suzan C. L. Mendonça, pelas sugestões.

Aos funcionários do Laboratório de Parasitologia: Graça, Geraldo, Elaine, Rosângela, Sheila e em especial à bióloga Maria do Rosário Gonçalves-Pires, pela contribuição com as pesquisas e pelas risadas descontraídas.

À equipe de profissionais da Histologia-UFU, por permitirem o uso do criostato e por se mostrarem receptivos.

À todos profissionais da saúde das diversas cidades visitadas e também ao pessoal do Laboratório de Análises Clínicas Hospital de Clínicas da UFU, pelo empenho e ajuda na obtenção das amostras.

Ao secretário da pós-graduação, João Martins Neto, pelas informações e atenção.

À toda equipe da garagem- FAEPU, especialmente ao chefe Maurílio por autorizar as viagens e também ao motorista Wilson que bondosamente nos

acompanhava na fase de colheita. Sem vocês esse trabalho não seria realizado no tempo previsto.

Às profissionais patologistas, enfermeiras, dentistas e acima de tudo, amigas queridas (Danielle, Cecília, Dayane, Fabíola, Flavinha, Solange e Patrícia) que muito contribuíram para realização deste trabalho e mais ainda, pela alegria com que faziam as tarefas.

Meu carinho especial à todos amigos de turma do mestrado, em especial, as amigas sempre presentes: à querida Rosângela M. Rodrigues por tantas horas de trabalho juntas que me fez enxergar em você, a pessoa especial que é.

À mais que amiga, confidente e imponente Bárbara por ter sido aquele ombro forte em tantos momentos difíceis.

À doce "cut" Flavinha, cujo agradecimento deve ser dobrado por ter dedicado horas do seu tempo ajudando na colheita de amostras. Aprendi e aprendo à cada minuto de convivência com vocês. Valeram os choros, risadas e lutas.

A todos amigos (visíveis e invisíveis) do Núcleo Servos Maria de Nazaré. Sei que sem todos eles não teria estrutura para suportar muita coisa...Em especial, meu carinho à Shyrlene Campos e Franklin Heibuth cujo exemplos de vida quero seguir sempre.

Jamais poderia esquecer de citar as carismáticas Denise e Rosineide (sem vocês talvez não estaria aqui hoje!). Valeram as aulas, o carinho e atenção. Admiro a bondade em vocês. Aos amigos Gleyce (quantas risadas, heim amiga?), Cláudio e todos ingressantes novos do mestrado que muito me ensinaram....

Ao Miguel pelas pesquisas e horas na Internet.

A gratidão especial vai para todas as pessoas que possibilitaram o trabalho com a doação das amostras. São as pessoas "anônimas" que fazem a ciência caminhar, a pesquisa existir. Meu mais que muito obrigada a todos eles que tão carinhosamente nos receberam em seus lares ou muitas vezes, em um leito de dor, mas que com um sorriso nos lábios foram capazes de se doarem "biológica e emocionalmente".

Meu muito obrigada à todos cujos nomes não estão citados nestas páginas mas que não se apagarão das páginas que compõe a história da minha vida.

RESUMO

O nematódeo *Strongyloides stercoralis* é um parasito comumente encontrado infectando o homem em áreas tropicais e subtropicais. O diagnóstico definitivo da parasitose se dá pela visualização das larvas do parasito nas fezes. Poucas larvas do parasito são eliminadas no material fecal, tornando pouco sensíveis as técnicas parasitológicas de rotina. Testes imunológicos específicos proporcionam maior sensibilidade e, portanto, são de grande auxílio no diagnóstico na estrogiloidíase. Trabalhos recentes na pesquisa de anticorpos específicos a protozoários e na neurocisticercose humana, apontam a secreção salivar como fluido alternativo complementar no diagnóstico dessas infecções, mostrando elevada sensibilidade nos testes, além de apresentar vantagens como praticidade na colheita, fácil manuseio, menor risco de contaminação do manipulador. O objetivo deste trabalho foi detectar anticorpos específicos das classes IgA e IgG anti- *S. stercoralis*, em amostras de soro e saliva total na estrogiloidíase humana, buscando comparar resultados obtidos nas duas espécimes amostrais frente aos testes imunológicos de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Amostras pareadas de soro e saliva de 118 indivíduos foram testadas para detecção de IgA e IgG anti-*Strongyloides*, utilizando-se antígeno heterólogo de *Strongyloides ratti*, pelas reações de RIFI e ELISA em 48 indivíduos *Strongyloides* positivos (grupo I), 35 com outros parasitos intestinais (grupo II) e 35 copronegativos (grupo III). Maior positividade foi detectada no grupo I, pela RIFI em amostras de saliva para IgA (72,9%) e 70,8% nas amostras de soro para IgG. Da mesma forma, os valores expressos em média geométrica por meio de D.O_ IE (densidade óptica- índice ELISA) das amostras mostraram maior reatividade para IgG no soro (122, 6 IE) que IgA (114, 8 IE). Todos os grupos, apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, para as amostras de soro e saliva ($p < 0,05$), exceto para detecção de IgG no grupo III. No grupo I, os índices de correlação dos níveis de anticorpos IgA e IgG (IE) entre as amostras de soro e saliva foram de 0, 4194 e 0, 4474, respectivamente. Ao comparar os testes RIFI e ELISA nas duas amostras, observou-se elevados valores de positividade no ELISA para IgA (66,7%) e 77,1% para IgG, ambos no soro (grupo I). Maiores resultados concordantes foram observados na detecção de IgA nos dois testes imunológicos. Os resultados permitem concluir que a saliva pode ser utilizada como fluido alternativo no teste RIFI, complementando o diagnóstico parasitológico da estrogiloidíase. Os dois testes associados para detecção de anticorpos IgA e IgG em ambas amostras, são de grande utilidade para o diagnóstico precoce da estrogiloidíase humana.

Abstract

Strongyloides stercoralis is a nematode parasite that commonly infects the man in tropical and sub-tropical areas. A definitive diagnosis is provided by the larval form visualization in feces. Since few parasite larvae are shed in fecal material, routine parasitologic techniques have shown low sensitivity. Serological assays provide more sensitivity and represent a helpful method for the diagnosis of strongyloidiasis. Recent studies on specific antibodies to protozoan and human neurocysticercosis, have pointed out the salivary secretion as complementary alternative fluid for the diagnosis of these infections, presenting advantages as practical collection, easy handling, low contamination risk to handler. The aim of this study was to detect IgA and IgG antibodies to *S. stercoralis* in serum and saliva samples in human strongyloidiasis using the indirect immunofluorescence test (IFI) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A total of 118 paired human serum and saliva samples were tested in IFAT and ELISA using heterologous antigen of *Strongyloides ratti*. From 118 samples, 48 were of patients with strongyloidiasis (group I), 35 with other intestinal parasitoses (group II), and 35 of copronegative healthy subjects (group III). The highest seropositivity was found in the group I by IFI, with rates of 72.9% for salivary IgA and 70.8% for serum IgG. Similarly, the geometric mean of the values of ELISA index obtained from serum IgG (EI: 122.6) were higher than for serum IgA (EI: 114.8). All the groups showed statistically significant differences between serum and saliva samples ($p < 0.05$), save the detection of IgG in the group III. In the group I, the coefficients of correlation between levels of specific IgA and IgG antibodies detected in serum and saliva samples were 0.4194 and 0.4474, respectively. Comparing IFI and ELISA results obtained in the group I, high positivity rates were found in ELISA for both serum IgA (66.7%) and serum IgG (77.1%). Higher concordant results were found for the detection of IgA in both serological assays. Based on the results, it can be conclude that saliva can be used as an alternative fluid in IFI, thus complementing the parasitologic diagnosis of strongyloidiasis. The association of both tests for the detection of IgA and IgG antibodies in serum and saliva samples represents a useful tool for the early diagnosis of human strongyloidiasis.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVOS	9
3 – MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 – População de estudo	10
3.2 – Amostras de soro	10
3.3 – Amostras de saliva	11
3.4. Diagnóstico Parasitológico	11
3.4.1 - Método de Baermann-Moraes	11
3.4.2 - Método de Lutz	12
3.5. Diagnóstico Imunológico	12
3.5.1 - Obtenção de larvas de <i>Strongyloides ratti</i>	12
3.5.2 - Obtenção de antígeno de <i>S. ratti</i> para Reação de Imunofluorescência Indireta	13
3.5.3 -Reação de Imunofluorescência.Indireta para detecção de IgA e IgG nas amostras de soro e saliva	13
3.5.4 - Produção do Extrato Alcalino de <i>S. ratti</i> para teste ELISA	15
3.5.5 - Teste Imunoenzimático ELISA para detecção de IgA e IgG em amostras de soro e saliva	15
3.6 - Análise estatística	16
3.7 - Normas de biossegurança	17
3.8 - Retorno aos participantes	17
4 – RESULTADOS	18
4.1 - Caracterização dos indivíduos em estudo	18
4.2 - Diagnóstico Imunológico	19
4.2.1 - Detecção de anticorpos IgA e IgG anti- <i>Strongyloides</i> pela RIFI	19
4.2.2 – Detecção de anticorpos IgA e IgG anti- <i>Strongyloides</i> pelo teste ELISA	21
4.2.3 - Correlação dos níveis de anticorpos específicos IgA e IgG anti <i>Strongyloides</i> em amostras de soro e saliva	23
4.2.4 - Positividade dos testes RIFI e ELISA na detecção de IgA e IgG anti <i>Strongyloides</i>	25
4.2.5 - Concordância e Discordância das amostras de soro e saliva frente aos testes Imunológicos	26
5 – DISCUSSÃO	28
6 – CONCLUSÕES	34
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXOS	42

1. INTRODUÇÃO

O helminto *Strongyloides stercoralis* foi primeiramente observado em 1876 pelo médico francês Louis Normand, em soldados que retornaram da Cochinchina (atual Vietnã), e descrito por Bavay em 1876 como *Anguillula stercoralis* para os parasitos encontrados na luz intestinal e como *Anguillula intestinalis* para os obtidos de necropsia. Leuckart (1911) demonstrou serem as duas formas pertencentes à mesma espécie, com uma forma partenogenética e outra de vida livre, passando a denominá-la *S. stercoralis* (PESSÔA; MARTINS, 1982).

A infecção pelo *S. stercoralis* (Bavay, 1876), denominada estrogiloidíase, acomete cerca de 30 milhões de pessoas em 70 países. A importância desta infecção está no fato de que, frequentemente, resulta em doença intestinal crônica assintomática, podendo permanecer indetectável por décadas (SIDDIQUI; BERK, 2001). A estrogiloidíase tem distribuição mundial heterogênea, podendo a prevalência da infecção pelo *S. stercoralis* ser dividida em: esporádica (<1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%). As áreas hiperendêmicas estão situadas nos trópicos. Na Europa, a infecção prevalece em pessoas que trabalham no campo, enquanto nos países tropicais a doença acomete principalmente crianças, pelo seu contato frequente com solos contaminados (PIRES; DREYER, 1993; PAULA *et al.*, 2000). Nas Américas, é encontrada desde o Canadá até a Argentina e Chile, havendo predominância em áreas tropicais úmidas. Focos de elevada endemicidade são encontrados em países como Colômbia com 20% de positividade, no Peru com 48% e no Brasil (Vale do Rio Doce- Minas Gerais) com 58% de exames positivos (REY, 2001).

O gênero *Strongyloides*, único representante da família Strongyloididae, apresenta 52 espécies podendo o homem ser acometido por duas delas: *S. stercoralis* e *S. fuelleborni*, sendo que esta última apresenta uma sub espécie, *S. f. kellyi*. A primeira espécie tem distribuição

mundial, a segunda é encontrada na África e a subespécie foi descrita parasitando crianças em Papua- Nova Guiné (GROVE, 1996).

A forma parasitária de *S. stercoralis* é constituída somente por fêmeas partenogénicas que possuem aspecto filiforme, medindo cerca de 2,2 mm de comprimento, com aproximadamente 5 μm de diâmetro; o intestino é simples, abrindo-se para o exterior através do orifício anal, situado próximo da extremidade posterior que é afilada e curvada no sentido ventral; a cutícula é fina e transparente. Os parasitos vivem habitualmente na mucosa do intestino delgado, especialmente no duodeno e jejuno. Os ovos são elipsóides, medem cerca de 70 x 40 μm de tamanho e são raramente visualizados nas fezes, dando origem às larvas rabditóides (REY, 2001).

As larvas rabditóides medem 200 a 300 μm de comprimento, possuem esôfago do tipo rabditóide com dilatações nas extremidades e constrição na parte mediana e caracterizam-se por apresentar um vestibulo bucal curto e um esboço genital desenvolvido. Essas larvas dão origem às larvas filarióides, medindo cerca de 500 μm de comprimento, corpo afilado terminando em uma ponta entalhada e esôfago longo, correspondendo à metade de seu comprimento, sem dilatação bulbar. As larvas filarióides são bastante ativas e podem permanecer vivas durante aproximadamente cinco semanas, porém completam a sua evolução ao encontrarem um hospedeiro, após penetração na pele ou mucosa (REY, 2001).

Os adultos de vida livre resultam da evolução de larvas rabditóides eliminadas para o meio externo através das fezes. O macho mede 0,7 mm, o esôfago é rabditóide e o aparelho digestivo termina em uma cloaca cuja extremidade posterior é recurvada ventralmente e possui espículas utilizadas na cópula. A fêmea mede de 1 a 1,5 mm, possui corpo fusiforme, com extremidade anterior romba contendo boca, cercada de três pequenos lábios. O esôfago é

rabbitóide, tendo aparelho digestivo simples que termina no ânus, próximo à extremidade posterior, constituída de uma cauda afilada (REY, 2001).

O ciclo de vida de *S. stercoralis* pode ser indireto (vida livre) ou direto (parasitário). No ciclo de vida livre, as larvas rabbitóides eliminadas nas fezes sofrem quatro mudas em dois a cinco dias, originando fêmeas e machos de vida livre. O macho fertiliza a fêmea, a qual deposita ovos no solo e estes desenvolvem-se rapidamente, liberando larvas rabbitóides, que por sua vez evoluem para larvas filarióides infectantes. No ciclo parasitário, as larvas filarióides, quando em contato com a pele ou mucosa do homem, penetram ativamente atingindo pequenos vasos, de onde são transportadas pela circulação venosa até o lado direito do coração. Através das artérias pulmonares chegam aos capilares, penetram nos alvéolos e ascendem até a traquéia através dos cílios do epitélio respiratório à nasofaringe, onde são deglutidas. No duodeno, transformam-se em fêmeas partenogéticas e iniciam a oviposição dando origem às larvas rabbitóides (ANDRADE NETO; ASSEF, 1996).

No homem, pode ocorrer auto-infecção interna ou externa. Na primeira, as larvas rabbitóides transformam-se em filarióides dentro do intestino, penetrando através da mucosa e completando o ciclo pulmonar. Na auto-infecção externa, as larvas filarióides resultantes da evolução de larvas rabbitóides presentes na região anal e perianal, penetram ativamente na pele e completam normalmente o ciclo. A estrongiloidíase, nos casos de auto-infecção contínua, pode persistir por muitas décadas após o indivíduo ter sido infectado, mesmo na ausência de novas infecções (LIU ; WELLER, 1993; REY, 2001).

A infecção no homem ocorre, na maioria das vezes, através da penetração ativa das larvas filarióides na pele e ocasionalmente através da ingestão de água ou alimentos contaminados com penetração através da mucosa oral, esofágica ou gástrica (FERREIRA, 1991).

Segundo GROVE (1996) os corticosteróides e seus metabólicos exercem um efeito estimulatório direto sobre as larvas intra-intestinais, acelerando sua conversão de rabaditóides para filarióides infectantes e aumentando a oviposição das fêmeas.

O envolvimento de mecanismos imunológicos no processo fisiopatológico da infecção pelo *S. stercoralis* ainda não está bem elucidado (FOGAÇA *et al.*, 1990). Em camundongos a imunidade à larva filarióide é dependente de complemento, eosinófilos e IgM. As células T-*helper* (Th) tipo 2 estão associadas à respostas contra alérgenos e patogénos, secretando interleucinas (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) que induzem células B a produzirem anticorpos tais como IgE e IgG4. No mecanismo T-independente, moléculas inflamatórias inespecíficas secretadas por macrófagos, incluindo Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e IL-1, contribuem para a proliferação das células caliciformes e provocam aumento da secreção de muco, revestindo assim os parasitos e levando-os à expulsão (COSTA-CRUZ, 2000).

A descrição da Imunoglobulina A (IgA) sérica e de algumas de suas propriedades por Heremans; Heremans e Schultze (1959), foi o ponto de partida para estudos de vários autores nas respostas deste anticorpo às parasitoses (LAMM, 1976; BRANDTZEG, 1985; DELACROIX, 1985; MESTECKY *et al.*, 1986; CONLEY; DELACROIX, 1987). A IgA sérica representa uma parcela que varia de 10 a 15% do total de imunoglobulinas circulantes. 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 três a seis dias sendo que grande quantidade dessa imunoglobulina é produzida na medula óssea. O catabolismo da IgA é relativamente rápido em relação à IgG e isso pode resultar em baixos níveis séricos de IgA (DELACROIX *et al.*, 1982; CONLEY; DELACROIX, 1987).

A IgA é dentre as imunoglobulinas, a mais presente na mucosa do trato respiratório saudável, além de ser importante na defesa intestinal. Esta promove fagocitose com ligação

nos receptores expressos na superfície de eosinófilos, neutrófilos e monócitos/macrófagos, neutraliza vírus em células epiteliais e ativa a via alternativa do sistema complemento (SALVI; HOLGATE, 1999).

A forma dimérica da IgA (IgA secretória- IgAs) está ligada a outra proteína denominada peça secretora, que é produzida por células epiteliais. Este componente facilita o transporte e impede a ação proteolítica sobre a IgA (SALVI; HOLGATE, 1999). Esta imunoglobulina encontra-se, predominantemente, em secreções seromucosas como saliva, lágrima, colostro, leite, líquor, além de secreções traqueobrônquicas, intestinais e geniturinárias (RÚPOLO; MIRA; KANTOR JUNIOR, 1998). A descoberta de que, dentre as imunoglobulinas, a IgA é a classe predominante nas secreções intestinais, contribuiu para avanços no campo da imunologia de mucosa (CHODIRKER; TOMASI, 1963).

O papel da resposta humoral na estrogiloidíase crônica, pela detecção de diferentes imunoglobulinas aos antígenos de larvas filarióides de *S. stercoralis*, foi examinado em ex-prisioneiros de guerra infectados cronicamente há 30 anos. Foi postulado que respostas mediadas por IgA inibem a fecundidade do verme e a viabilidade dos ovos na estrogiloidíase humana, enquanto as mediadas por IgE estão envolvidas na regulação da autoinfecção das larvas e que IgG4 bloqueia respostas alérgicas mediadas por IgE e portanto, podem permitir a persistência da estrogiloidíase crônica assintomática (ATKINS *et al.*, 1999).

A triagem clínica clássica de pacientes com suspeita de estrogiloidíase ocorre quando os mesmos apresentam diarreia, dores abdominais, urticária e eosinofilia sanguínea (GROVE, 1996). Possuindo a estrogiloidíase sintomas pulmonares e digestivos comuns a outras doenças parasitárias, o diagnóstico clínico é difícil (LIU; WELLER, 1993).

Tem-se a confirmação de estrogiloidíase pelo encontro de larvas de *S. stercoralis* nas fezes, porém podem ser encontradas no aspirado duodenal, urina, escarro ou ocasionalmente

em outros fluidos corporais e amostras de tecidos (ONUIGBO; IBEACHUM, 1991). No entanto, a confirmação parasitológica da infecção em exames de fezes específicos (Baermann-Moraes e Lutz) é extremamente difícil, uma vez que, em mais de 2/3 dos casos, existe no máximo 25 larvas por grama de fezes (SIDDIQUI; BERK, 2001). A realização de apenas uma colheita de fezes é insuficiente para detecção de larvas em até 70% dos casos. A sensibilidade do teste parasitológico é de 50% com 3 amostras de fezes e pode atingir até 100% se 7 amostras de fezes seriadas forem examinadas (LIU; WELLER, 1993; DREYER *et al.*, 1996).

A detecção de diferentes classes de imunoglobulinas totais e específicas para *S. stercoralis* em amostras de soro, tem provado a sua eficácia quando utilizadas para auxiliar exames coproparasitológicos. Os métodos mais empregados são a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando antígenos homólogo ou heterólogo para detecção de anticorpos específicos (COUDERT *et al.*, 1968; GROVE; BLAIR, 1981; COSTA-CRUZ *et al.*, 1997; MACHADO *et al.*, 2001), e o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (ROSSI *et al.*, 1993a; ATKINS *et al.*, 1999; PAULA *et al.*, 2000). 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 nas concentrações de IgM e IgA nos três grupos, quando comparado com o grupo controle. Não foi observado alteração na concentração de IgG (FOGAÇA *et al.*, 1990).

Os testes RIFI e ELISA, comumente utilizados, detectam as diferenças entre as imunoglobulinas presentes nos indivíduos infectados, as correlações destas com diversos estágios da doença, além de expressar a especificidade e sensibilidade das reações (GENTA; GARY; WEIL, 1982; ROSSI *et al.*, 1993b; COSTA-CRUZ *et al.*, 1999a).

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).

Strongyloides ratti (Sandground, 1925) é um parasito de rato e camundongos e infecta com maior facilidade o rato branco mantido em laboratório. A cultura de fezes infectadas permite a obtenção de um grande número de larvas filarióides, simplificando a obtenção do antígeno (ROSSI *et al.*, 1993b). A composição antigênica de *S. ratti* foi comparada com a de *S. stercoralis*, demonstrando ser possível sua utilização como antígeno heterólogo, provendo fonte segura de antígeno para o diagnóstico da estrogiloidíase em laboratório (GROVE; BLAIR, 1981; NAGESWARON; CRAIG; DEVANEY, 1994; SATO; KOBAYASHI; SHIROMA, 1995). O uso de extrato alcalino e de antígeno heterólogo são recomendados pela praticidade no preparo e pelo rendimento em concentração protéica, quando se trabalha na detecção de anticorpos específicos anti- *S. stercoralis* (COSTA-CRUZ *et al.*, 1999a; PAULA *et al.*, 2000).

Recentemente tem se pesquisado a presença de anticorpos salivares específicos para diferentes doenças infecciosas, bem como para pesquisa de biomarcadores na epidemiologia e toxicologia (CHICHARRO *et al.*, 1998). A quantificação de anticorpos em amostras de saliva, tem sido realizada para diferentes protozoários (MURO *et al.*, 1990; LOYOLA *et al.*, 1997; PINHO *et al.*, 1999) e na neurocisticercose humana (BUENO *et al.*, 2000). No entanto, de acordo com a literatura consultada, não foi observado a pesquisa de anticorpos salivares na estrogiloidíase humana.

As vantagens da pesquisa em amostras de saliva são maior aceitabilidade (não invasiva, ausência de dor), maior conveniência (baixo custo e colheita rápida) e oferece menor risco de

contaminação ao manipulador (PARRY, 1993; SMITH; BOWEN, 2000; SANCHEZ-MARTIN *et al.*, 2001).

A cidade de Uberlândia- MG foi considerada hiperendêmica quando 13% de positividade para *S. stercoralis* foi detectada por Machado e Costa-Cruz (1998) após a análise de 9900 lâminas de exame de fezes de crianças de quatro meses a sete anos de idade.

Exames coproparasitológicos realizados por Oliveira *et al.* (2002) em 45 indivíduos alcóoltras crônicos provenientes do município de Uberlândia, constataram a presença de larvas de *S. stercoralis* em 33% dos indivíduos.

Considerando que o município de Uberlândia, foi descrito como área hiperendêmica para a estrogiloidíase e tendo em vista o grande interesse dos pesquisadores na utilização de amostras biológicas que viabilizem a realização dos testes imunológicos, decidiu-se avaliar a saliva como fluido alternativo no diagnóstico complementar desta parasitose.

2. OBJETIVOS

Geral

- Detectar e quantificar os anticorpos IgA e IgG específicos em amostras pareadas de soro e saliva na estrogiloidíase humana.

Específicos

- Analisar os testes RIFI e ELISA para detecção de IgA e IgG em amostras de soro e saliva.
- Comparar os níveis das duas imunoglobulinas IgA e IgG específicas nas amostras de soro e saliva.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População de estudo

Foram analisadas amostras pareadas de soro e saliva de 118 indivíduos provenientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, dos postos de saúde municipais dos distritos de Uberlândia e duas cidades vizinhas (Araguari e Tupaciguara) localizadas no Triângulo Mineiro, Minas Gerais - região sudeste do Brasil.

Dos 118 indivíduos estudados, 48 estavam monoparasitados, eliminando larvas de *S. stercoralis* nas fezes (grupo I), 70 constituíam os indivíduos controles, sendo 35 monoparasitados para outros parasitos intestinais (grupo II) e 35 indivíduos copronegativos (grupo III). Os exames de fezes dos indivíduos pertencentes aos grupos I e II foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia ou nos postos de saúde municipais dos distritos e cidades vizinhas. O grupo III foi definido após a análise de exames parasitológicos realizados a partir da colheita de três amostras de fezes, pelos testes de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e Lutz (LUTZ, 1919), no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Esse trabalho obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

3.2. Amostras de soro

Foram colhidos 10mL de sangue dos 118 indivíduos através de punção venosa (VACUTAINER- Precision Glide/ Becton Dickson Vacutainer System, Franklin Lakes, NJ, EUA). As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia do Instituto de

Ciências Biomédicas, para obtenção do soro após centrifugação (Fanem, São Paulo) a 350 x g por 5 minutos. As amostras de soro foram distribuídas em alíquotas e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

3.3. Amostras de saliva

As amostras de saliva total foram obtidas a temperatura ambiente com auxílio de um pedaço de algodão limpo. Antes do procedimento, foi realizada avaliação bucal clínica dos indivíduos por um odontologista, para posterior limpeza da cavidade oral por meio do enxágue com água. Um volume de aproximadamente 3mL por indivíduo foi colhido e distribuído em alíquotas, sendo conservados a -20°C. No momento da realização dos testes imunológicos, as amostras de saliva foram descongeladas lentamente e centrifugadas a 12.400 x g a 4°C durante 15 minutos (Sorvall RC 5C plus, EUA). O sobrenadante foi utilizado para pesquisa de anticorpos das classes IgA e IgG anti-*Strongyloides*.

3.4. Diagnóstico Parasitológico

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

Aproximadamente 8 a 10 gramas de fezes foram colocados em uma gaze dobrada em quatro sobre uma tela metálica com 100 malhas por cm². O material foi colocado num funil de vidro com diâmetro de 11,5 cm, cuja haste foi colocada uma mangueira de borracha de 10 cm, obliterando a pinça contendo água a 45°C até a borda e deixando a gaze em contato com a

água por uma hora. Após este período, o sedimento foi colocado em uma lâmina, acrescentado uma gota de lugol (Doles, Goiás), homogeneizado e adicionado uma lamínula (24 X 24 mm) para posterior visualização em microscópio óptico (Olympus, CH-2, Japão) em aumentos de 100 e 400X. Das três amostras colhidas para cada indivíduo pertencente ao grupo III, foram preparadas três lâminas por amostra e lidas por dois examinadores.

3.4.2. Método de Lutz (1919)

Cerca de 2 gramas de fezes foram colocados em um "becker" com cerca de 5 mL de água e triturados com auxílio de um bastão de vidro. Em seguida acrescentou-se 20 mL de água, filtrando a suspensão resultante para um cálice cônico de 200 mL de capacidade, utilizando uma tela de nylon com cerca de 80 a 100 malhas por cm^2 e uma gaze cirúrgica dobrada em quatro.

Os resíduos contidos na gaze foram lavados com 20 mL de água, sendo o líquido da lavagem, recolhido no mesmo cálice e completado para 200 mL. A suspensão de fezes permaneceu em repouso durante 24 horas. Posteriormente, uma gota do sedimento foi colocada numa lâmina de microscopia, acrescentado lugol, homogeneizado (Doles, Góias), colocado uma lamínula (24 X 24 mm) e examinado em microscópio óptico (Olympus CH-2, Japão) nos aumentos 100 e 400X. Foram lidas três lâminas das três amostras colhidas por dois examinadores.

3.5. Diagnóstico Imunológico

3.5.1. Obtenção de larvas de *Strongyloides ratti*

Após 10 dias da inoculação de 2.000 larvas de *S. rattii*, por via subcutânea, em *Rattus rattus* mantidos infectados experimentalmente, fez-se a colheita de fezes para cultivo pelo método de Looss (Neves *et al.*, 2000). No 5^o dia, as larvas foram obtidas pelo método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948). Parte das larvas foram utilizadas para manutenção do ciclo evolutivo em *R. rattus* e a outra foi mantida a -20°C para preparo dos antígenos.

3.5.2. Obtenção do antígeno de *S. rattii* para Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Larvas de *S. rattii* foram incluídas em Tissue Teck O. C. T. (Polyvinyl alcohol, polyethylene glycol/ Miles, Elkahart, EUA) e submetidas a cortes de 4 micra de espessura em criostato (International Cryostat IEC, CTI- Mass, USA) a -30°C. Os cortes foram depositados em lâminas de microscopia extra fina previamente desengorduradas e conservadas a -20°C segundo Costa-Cruz *et al.* (1997).

3.5.3 Reação de Imunofluorescência Indireta para detecção de IgA e IgG nas amostras de soro e saliva

As amostras de soro foram primeiramente testadas na diluição 1:10 e as de saliva a 1:2.

No momento da realização deste teste, diferentes diluições dos conjugados e tempo de incubação das amostras de saliva, foram avaliados. Para o conjugado IgA nas amostras de soro e saliva, as diluições testadas foram 1:10, 1:50 e 1:100. Para o conjugado IgG nas amostras de

soro as diluições foram 1: 50, 1: 100 e 1:200 e nas amostras de saliva, 1: 25, 1:50 e 1:100. Amostras de saliva total foram incubadas em duplicata para teste, nos tempos: 30, 45 e 60 minutos.

Sobre as lâminas de microscopia contendo cortes de 4 micra das larvas, foram adicionadas amostras de soro e saliva padrão positivo e negativo diluídos em solução salina tamponada com fosfatos (PBS), pH 7,2 a 0,01M. Nas amostras de soro a diluição ideal foi de 1:10 para IgA, 1:20 para IgG e 1:2 nas amostras de saliva para ambos anticorpos. Amostras positivas e negativas foram testadas isoladamente nas diluições acima citadas. Após o tempo ideal de incubação de 30 minutos para amostras de soro e de 45 minutos de incubação para amostras de saliva a 37°C em câmara úmida, as lâminas foram lavadas em PBS por cinco minutos (3 vezes), sendo adicionados respectivamente, os conjugados anti-IgA (cadeia α específica – Sigma, St. Louis, EUA) e anti-IgG (cadeia γ específica - Sigma) humana marcados com fluoresceína, diluídos em solução de PBS e azul de Evans a 3%, nos títulos ideais de 10 para anti-IgA (Sigma) e 100 para anti-IgG no soro, sendo que para saliva, os títulos ideais do conjugado foram de 10 para anti-IgA, e 50 para anti-IgG. Após 30 minutos de incubação a 37°C, para ambos conjugados, 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 fluorescência de controles positivos e negativos, sendo os resultados expressos em títulos. Foram consideradas reagentes as amostras de soros com título ≥ 10 para IgA, ≥ 20 para IgG e ≥ 2 para os dois anticorpos em amostras de saliva. Amostras positivas foram diluídas na razão 2 para titulação dos anticorpos circulantes.

3.5.4. Produção do Extrato Alcalino de *S. ratti* para teste ELISA

Foi adicionado 1mL de NaOH (Merck, Alemanha) 0,15M às 100.000 larvas obtidas (item 3.5.1.). O material permaneceu em incubação por seis horas a 4°C sob agitação lenta. Seguiu-se a adição de 0,5 mL de HCl 0,3M (Merck, Alemanha) até atingir pH entre 7 e 7,5. Em seguida, o material foi centrifugado a 12.400 x g por 30 minutos a 4°C (Sorvall RC plus, EUA). O conteúdo protéico do sobrenadante foi dosado pelo método de Lowry *et al.* (1951), obtendo concentração protéica de 200µg/mL.

3.5.5. Teste Imunoenzimático ELISA para detecção de IgA e IgG em amostras de soro e saliva

Para padronização do teste em amostras de saliva (três amostras reagentes e três não reagentes pela RIFI), conjugados IgA e IgG foram analisados nas diluições, 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:4000. A incubação das amostras foram avaliadas durante 45, 60, 90 e 120 minutos. Foram empregadas microplacas de poliestireno (DIFCO, Interlab, São Paulo) como suporte para adsorção de 50µL do antígeno alcalino de *S. ratti* na concentração ideal de 10µg/mL isoladamente. As placas foram sensibilizadas a 4°C durante 18 horas em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M, pH 9,6. Após este período e três lavagens de cinco minutos com PBS acrescido de Tween 20 (PBS/T) a 0,05% (Sigma, EUA), foram adicionados 50µL de amostras de soro, em duplicata, nas diluições de 1:10 (IgA) e 1:20 (IgG) e amostras de saliva, em duplicata, diluídas a 1:2 em PBS/T para ambas imunoglobulinas. Após incubação por 45 minutos em câmara úmida a 37°C para soro e 60 minutos para saliva, seguiu-se três lavagens de 5 minutos com PBS/T para posterior adição de 50µL do conjugado anti-IgA e anti-IgG

humanas marcados com peroxidase (Sigma, EUA), nos títulos ótimos de 1.000 para IgA, 2.000 para IgG nas amostras de soro e 500 para IgA e IgG nas amostras de saliva, por um período ideal de 45 minutos a 37°C. Após três lavagens, a reação foi revelada pela adição de 50µL do substrato H₂O₂ a 30% (Merck, Alemanha), solução cromógena de ortofenileno diamina [(OPD), Merck, Alemanha] 5mg OPD + 12,5 mL de Tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,5 (Na₂HPO₄ + ácido cítrico) + 5µL H₂O₂ 30%], preparado no momento do uso. Após 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de solução 2N de H₂SO₄ (Merck, Alemanha) e os valores da absorbância foram determinados a 490 nm em leitor de ELISA (Metrolab 980, Argentina).

Para análise individual das placas, os resultados foram expressos em Índice ELISA (IE), calculados segundo a fórmula: [(Densidade Óptica das amostras / valor do limiar de reatividade (*cut off*))] x 100, onde o *cut off* foi determinado pela média da absorbância de 3 controles negativos para cada espécime, acrescido duas vezes do desvio padrão (MADALENA, 1999).

O limiar de reatividade do teste ELISA foi definido como 100 IE (Índice ELISA).

3.6. Análise estatística

Comparações entre diferentes médias geométricas dos níveis de anticorpos IgA e IgG anti-*Strongyloides* determinados pelo teste ELISA foram analisados segundo o teste *Mann Whitney*. Dados de correlação entre amostras de soro e saliva para os dois anticorpos foram apresentados segundo “correlação de Spearman” ($p < 0,05$). Diferentes taxas de positividade aos testes RIFI e ELISA para as imunoglobulinas estudadas em amostras de soro e saliva, foram analisadas pelo teste exato de *Fisher*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados

estatisticamente significantes utilizando o *Software GraphPad Prism* versão 3.0 (GraphPad Software, Inc).

3.7. Normas de biossegurança

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

3.8. Retorno aos participantes

Os resultados dos testes imunológicos, bem como os parasitológicos, foram encaminhados aos participantes do trabalho. Os pacientes pertencentes aos grupos I e II, receberam antes da colheita do material, quando aceitaram participar, noções básicas de educação sanitária e também informações específicas sobre o parasito que albergavam.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização dos indivíduos em estudo

Dos 118 indivíduos analisados, dentre os 48 pertencentes ao grupo I, a idade variou de 02 a 71 anos. No grupo II, os 35 indivíduos analisados, apresentaram idade de 05 a 59 anos. Neste grupo, os indivíduos estavam monoparasitados por *Giardia lamblia* (11), *Ascaris lumbricoides* (9), ancilostomídeo (5), *Enterobius vermicularis* (3), *Entamoeba histolytica* (3), *Taenia* sp (2) e *Trichuris trichiura* (2). Nos 35 indivíduos copronegativos (grupo III) a idade variou de 01 a 66 anos.

A Tabela 1 apresenta a distribuição dos três grupos segundo o sexo dos participantes. Os anexos 1, 2 e 3 apresentam a relação dos indivíduos que compõem os três grupos, segundo sigla do nome, procedência, sexo, idade, resultados dos testes parasitológicos e imunológicos.

Tabela 1. Distribuição por sexo dos 48 pacientes com estrogiloidíase (grupo I), 35 pacientes com outras parasitoses intestinais (grupo II) e 35 indivíduos copronegativos (grupo III)

SEXO	TOTAL n (%)	GRUPOS		
		I n (%)	II n (%)	III n (%)
MASCULINO	54 (45,7%)	23 (48%)	19 (54,3%)	12 (34,3%)
FEMININO	64 (54,3%)	25 (52%)	16 (45,7%)	23 (65,7%)
TOTAL	118 (100%)	48 (100%)	35 (100%)	35 (100%)

4.2. Diagnóstico Imunológico

4.2.1. Detecção de anticorpos IgA e IgG-anti-*Strongyloides* pela RIFI

No grupo I, a presença de IgA circulante no soro foi verificada em 26 (54,2%) pacientes. Na saliva foram detectados 35 (72,9%) pacientes positivos para IgA. Para IgG, detectou-se 34 (70,9%) pacientes positivos no soro e 16 (33,3%) para IgG na saliva. Os resultados e as respectivas titulações estão resumidos na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2. Distribuição dos títulos de anticorpos IgA e IgG anti-*Strongyloides* detectados pelo teste de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em amostras de soro e saliva de 48 indivíduos do grupo I (*Strongyloides* +), 35 do grupo II (outras parasitoses intestinais) e 35 do grupo III (copronegativos)

Titulo	Grupo I n (%)	Grupo II n (%)	Grupo III n (%)
Soro – IgA			
< 10	22 (45,8)	35 (100)	35 (100)
10	21 (43,8)	0	0
20	04 (8,3)	0	0
40	01 (2,1)	0	0
Soro – IgG			
< 20	14 (29,1)	35 (100)	35 (100)
20	25 (52,1)	0	0
40	08 (16,7)	0	0
80	1 (2,1)	0	0
Saliva – IgA			
< 2	13 (27,1)	34 (97,1)	35 (100)
2	24 (50,0)	01 (2,9)	0
4	08 (16,7)	0	0
8	03 (6,2)	0	0
Saliva – IgG			
< 2	32 (66,7)	35 (100)	35 (100)
2	15 (31,2)	0	0
4	01 (2,1)	0	0
8	0	0	0

4.2.2. Detecção de anticorpos IgA e IgG anti-*Strongyloides* pelo teste ELISA

No grupo I, a média geométrica dos níveis de IgA anti-*Strongyloides* no soro foi de 114,8 IE, valor diferente estatisticamente ($p < 0,01$) do encontrado na saliva (88,0 IE). No grupo II os níveis de IgA foram significativamente maiores ($p < 0,001$) na saliva (74,5 IE) do que no soro (52,3 IE). Neste grupo, 2 (5,7%) indivíduos apresentaram-se reativos no soro para IgA e 4 (11,4%) na saliva. No grupo III, níveis no soro foram maiores que os obtidos na saliva ($p < 0,01$), somente 2 (5,7%) indivíduos foram reativos em amostras de soro. (Figura 1A).

Quanto aos níveis de IgG anti-*Strongyloides*, nos indivíduos do grupo I, a média geométrica no soro foi de 122,6 IE, valor significativamente superior ($p < 0,0001$) ao encontrado na saliva (75,2 IE). No grupo II os níveis de IgG no soro (61,3 IE) foram maiores que na saliva (42,1 IE) ($p < 0,001$). Para o grupo III, os valores de IgG na saliva (48,3 IE) foram maiores que no soro (40,8 IE), valores não estatisticamente diferentes ($p > 0,05$). Comparando-se as médias geométricas dos níveis de IgG no soro e na saliva entre grupos, os níveis do grupo I foram significativamente maiores do que os do grupo II e III ($p < 0,01$). No grupo II, detectou-se 2 (5,7%) indivíduos reativos no soro e, na saliva 1 (2,8%) indivíduo (Figura 1B).

Os indivíduos do grupo II que reagiram positivamente no ELISA para IgA e IgG estavam monoparasitados por: ancilostomídeo, *E. vermicularis*, *A. lumbricoides* e *E. histolytica*. Dos indivíduos do grupo II e III que tiveram reação positiva no ELISA, maior reatividade foi para IgA em amostras de saliva. Desses indivíduos, apenas um apresentava quadro de gengivite leve (segundo avaliação odontológica), os demais não apresentavam cárie ou qualquer distúrbio oral.

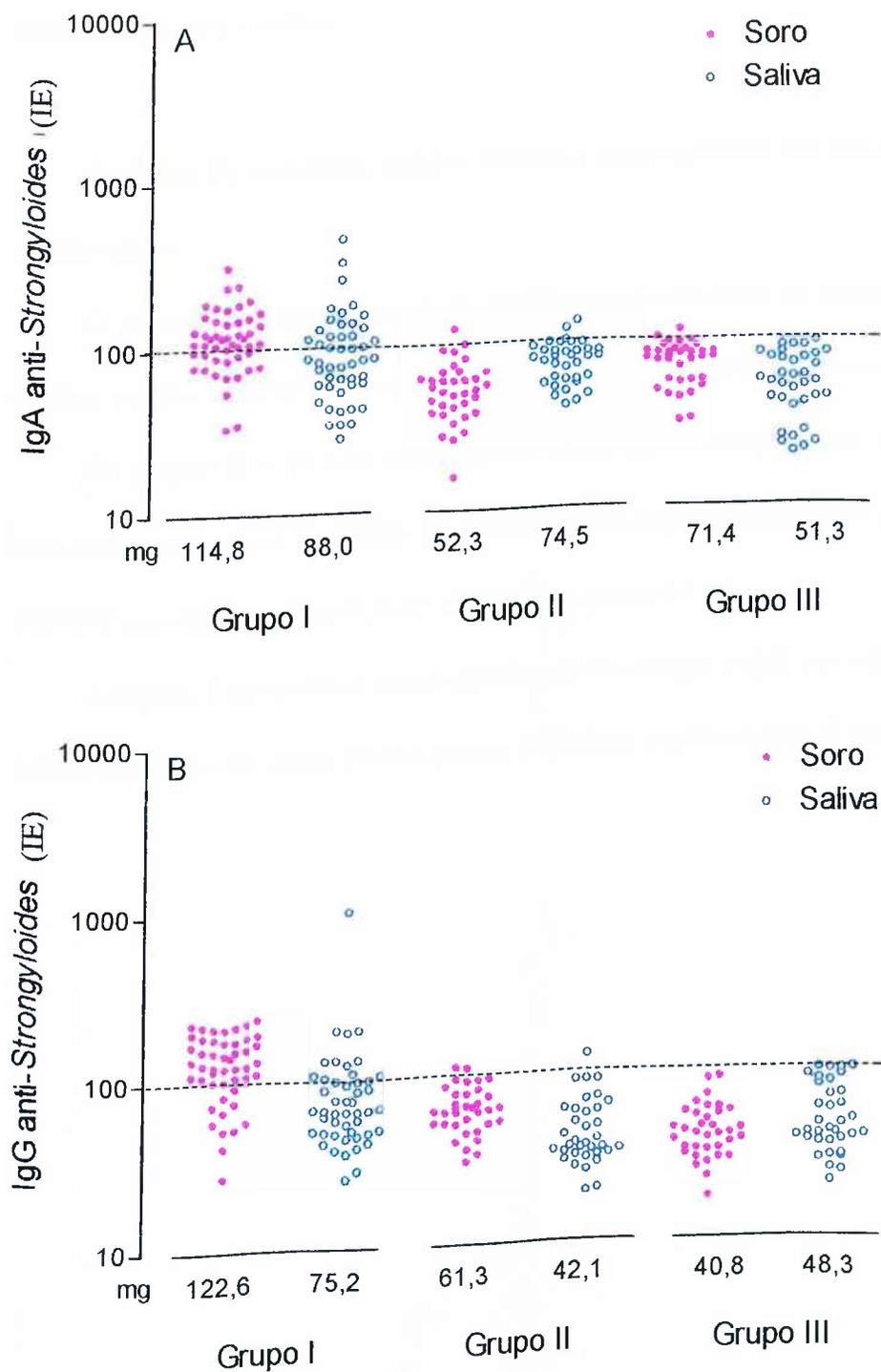


Figura 1. Níveis de IgA (A) e IgG (B) anti-*Strongyloides* determinados por ELISA e expressos em Índice ELISA (IE) em 48 amostras de soro e saliva de indivíduos do grupo I (*Strongyloides* +), 35 do grupo II (outras parasitoses intestinais) e 35 grupo III (copronegativos). A linha tracejada indica o limiar de reatividade do teste ELISA (100 IE). mg: média geométrica

4.2.3. Correlação dos níveis de anticorpos específicos IgA e IgG anti- *Strongyloides* em amostras de soro e saliva

Os dados de correlação positiva indicam a concomitância dos resultados tanto para soro quanto saliva.

O grupo I, apresentou correlação positiva moderada entre os níveis de IgA nas amostras de soro e saliva (0,4194). O mesmo ocorreu para IgG (0,4474). Ambos com valor de $p < 0,05$.

Os grupos II e III não apresentaram nenhuma correlação entre as amostras analisadas para ambos anticorpos ($p > 0,05$). Os valores foram respectivamente, no grupo II, de 0,06776 e 0,09317 para IgA e IgG de 0,2634 e 0,1478 no grupo III.

A Figura 2 apresenta a correlação dos níveis de IgA e IgG nas amostras de soro e saliva, expressos em índice ELISA para os indivíduos positivos para *S. stercoralis* (grupo I).

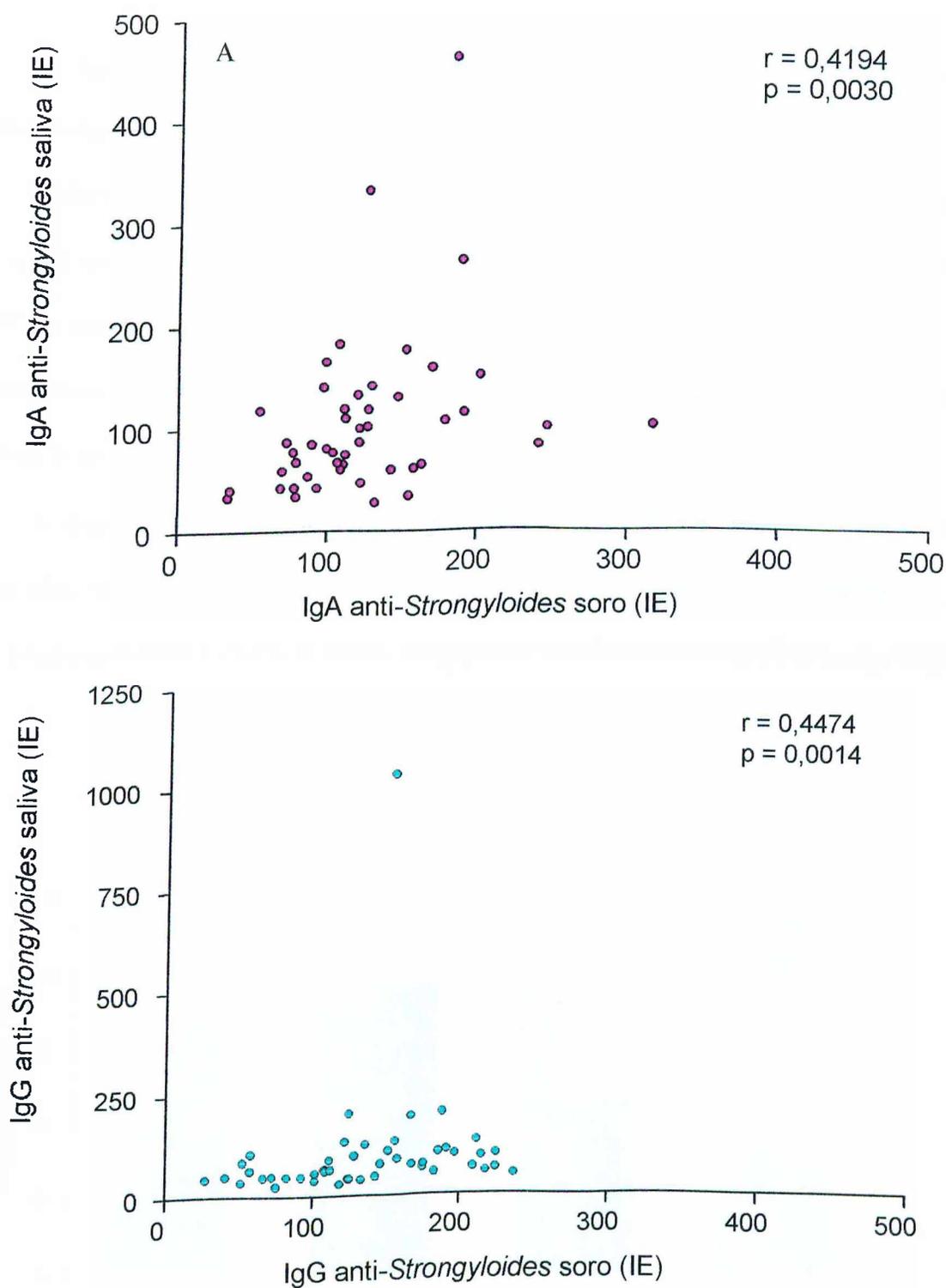


Figura 2. Correlação dos níveis dos anticorpos específicos anti-*Strongyloides* IgA (A) e IgG (B), expressos em índice ELISA (IE) entre amostras de saliva e soro de 48 pacientes do grupo I (*Strongyloides* +). Correlação de Spearman

4.2.4. Positividade dos testes RIFI e ELISA na detecção de IgA e IgG anti-*Strongyloides*

A figura 3 apresenta os valores de positividade de IgA e IgG em amostras de soro e saliva frente aos dois testes imunológicos.

Valores estatisticamente significantes foram observados na detecção de IgA em amostras de saliva onde a RIFI (72,9 %) apresentou maior positividade que o ELISA (45,8%) ($p < 0,05$). Considerando o teste ELISA, observou-se para o mesmo anticorpo, resultados não estatisticamente diferentes em amostras de soro (66,7%) quando comparados às amostras de saliva (45,8%) ($p > 0,05$).

A detecção de IgG no teste RIFI entre amostras de soro e saliva apresentou como resultados respectivos, 70,9% e 33,3% ($p < 0,05$). Da mesma forma, o ELISA detectou 77,1% nas amostras de soro e 29,2% na saliva, valores esses estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

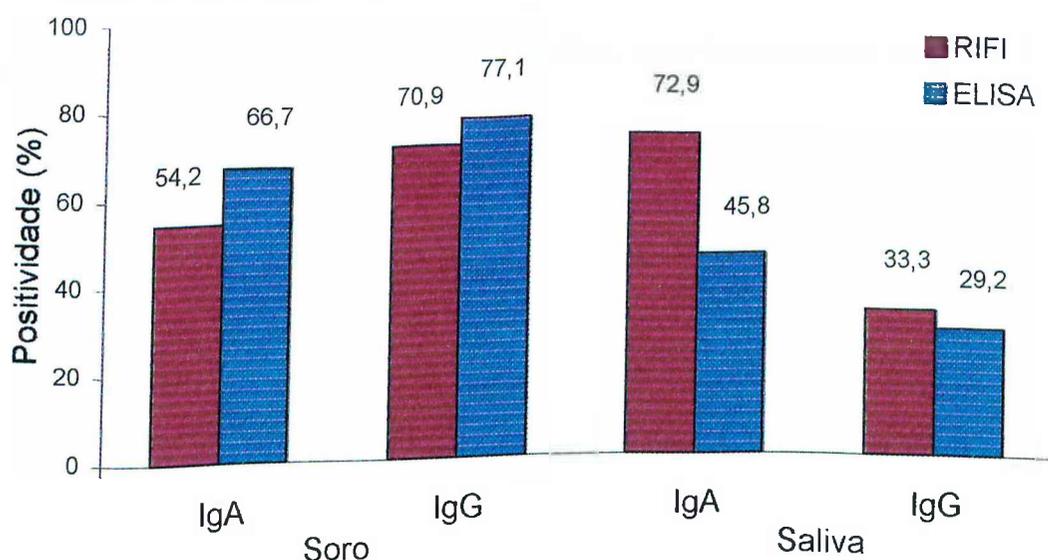


Figura 3. Testes RIFI e ELISA de acordo com a positividade dos anticorpos IgA e IgG anti-*Strongyloides*, em 48 amostras de soro e saliva dos indivíduos do grupo I (*Strongyloides*⁺).

4.2.5. Concordância e discordância das amostras de soro e saliva frente aos testes imunológicos

Utilizando a RIFI para detecção de IgA, 30 (62,5%) indivíduos apresentaram resultados concordantes entre amostras de soro e saliva. Maiores índices ($p < 0,05$) de concordância positiva para as amostras foram observados para IgA (22; 45,8%) quando comparados aos negativos (08; 16,7%). Para a mesma imunoglobulina, 13 (27,1%) indivíduos foram positivos somente nas amostra de saliva (soro - / saliva +). Para IgG, 22 (45,8%) indivíduos apresentaram-se positivos pelas amostras de soro (soro + / saliva -) (Tabela 3).

No teste ELISA a maior concordância dos resultados foi determinada para IgA (32; 66,7%) do que para IgG (23; 47,9%) ($p > 0,05$). Entre os discordantes, amostras de soro para detecção de IgA apontaram como positivos 13 (27,1%) indivíduos, estes apresentaram-se negativos na saliva (soro + / saliva -), sendo que para IgG, esse número foi de 24 (50,0%) indivíduos.

Todos os resultados concordantes e discordantes dos dois espécimes biológicos, das duas reações e das duas classes de imunoglobulinas estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Análise dos resultados concordantes e discordantes entre amostras de soro e saliva, quanto aos testes RIFI e ELISA na detecção de anticorpos IgA e IgG anti-*Strongyloides* em 48 pacientes do grupo I (*Strongyloides* +)

	Concordantes		Discordantes	
	Soro + / Saliva +	Soro - / Saliva -	Soro + / Saliva -	Soro - / Saliva +
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>RIFI</i>				
IgA	22 (45,8)	08 (16,7)	05 (10,4)	13 (27,1)
IgG	12 (25,0)	10 (20,8)	22 (45,8)	04 (8,3)
<i>ELISA</i>				
IgA	19 (39,6)	13 (27,1)	13 (27,1)	03 (6,3)
IgG	13 (27,1)	10 (20,8)	24 (50,0)	01 (2,1)

5. DISCUSSÃO

Testes parasitológicos, geralmente subestimam a prevalência de *S. stercoralis*, devido a baixa carga parasitária eliminada nas fezes (DREYER *et al.*, 1996). A aplicação de técnicas parasitológicas e imunológicas associadas, contribuem para o esclarecimento do diagnóstico clínico e epidemiológico da estrogiloidíase, propiciando adequada conduta terapêutica (PAULA *et al.*, 2000).

Em amostras de soro os testes de RIFI para IgG anteriormente padronizados por nossa equipe utilizando-se antígeno de *S. ratti* revelaram sensibilidade de 92,5% (COSTA-CRUZ *et al.*, 1997) e os testes ELISA detectaram positividade para IgA de 47,5% (COSTA-CRUZ *et al.*, 1999a) e 93,4% para IgG (COSTA-CRUZ *et al.*, 1999b).

No presente estudo, utilizando RIFI foi encontrado 54,2% de positividade para IgA e 70,8% para IgG nas amostras séricas. Resultados diferentes foram observados em indivíduos infectados cronicamente por *S. stercoralis*, onde foi detectada 92% de reatividade para IgG e ausência de positividade para IgA nas amostras de soro de 48 pacientes analisados pela RIFI com antígeno homólogo de *S. stercoralis* (GENTA; GARY; WEIL, 1982).

Não foi possível confrontar a acentuada positividade de IgA na saliva quando comparada ao soro, observados no presente trabalho, pelo fato de não serem conhecidos trabalhos em amostras de saliva na estrogiloidíase humana de acordo com a literatura consultada. Entretanto, acredita-se que os elevados níveis de IgA na saliva se devem por ser esta, dentre as imunoglobulinas salivares, a mais prevalente (aproximadamente 90%) principalmente na forma de sIgA (GRIMOUD *et al.*, 1996). Além disso, Carranza e Newman (1997) citaram que a IgA sérica representa um quinto da concentração de IgG no soro humano e apesar da acentuada concentração de IgG no soro, sua concentração nas secreções é baixa.

No teste ELISA, os valores expressos em média geométrica, no grupo I, foram maiores nas amostras de soro para IgG que IgA. Elevados valores foram também determinados por Rossi *et al.* (1993b) na detecção de IgG sérica (77,1%) em 27 pacientes com estrogiloidíase. Contudo, positividade de 83,3% e 89,5% para IgA e IgG, respectivamente, foram descritos por Genta *et al.* (1988).

Segundo a literatura, em amostras séricas de indivíduos com fase definida da infecção por *S. stercoralis*, a presença da IgA sugere reagudização da doença (ROSSI *et al.*, 1993b).

Níveis de anticorpos séricos anti-*S. stercoralis* podem permanecer elevados por longos períodos após o tratamento, com isso, o teste ELISA para detecção de IgG não distingue infecção aguda de crônica, mas um resultado positivo pode auxiliar a estabelecer o diagnóstico da infecção, principalmente em áreas de maior endemicidade (GENTA *et al.*, 1988).

No estudo realizado por Atkins *et al.* (1997), em uma população endêmica para *S. stercoralis* na Jamaica, verificaram que os níveis de IgG1 eram inversamente correlacionados com a idade. Foi observado, ainda, menor nível de IgE em grupos de idade avançada, enquanto os níveis de IgA foram similares em ambos grupos endêmicos (mais velhos: 30 a 80 anos e jovens: 6 a 29 anos), mas foram elevados em indivíduos infectados cronicamente. Os autores sugeriram que a idade estaria correlacionada com a infecção crônica por *S. stercoralis* em área endêmica e que a regulação de IgG4, precocemente, poderia facilitar a estabilização da infecção. Sugeriram também que, a elevada produção de IgA poderia estar envolvida no controle da infecção crônica, já que esse anticorpo interfere na redução da produção da IgG1.

Estudo da concentração das imunoglobulinas locais (IgA, IgM e IgG) pela técnica de Imunofluorescência direta utilizando fragmentos de intestino delgado, foi realizado por Fogaça *et al.* (1990). Os 32 pacientes com estrogiloidíase foram classificados em assintomáticos, sintomáticos leves e sintomáticos graves. Houve diminuição significativa da concentração de

IgA nos pacientes sintomáticos graves, diminuição de IgM nos três grupos e nenhuma alteração nos níveis de IgG. Os resultados demonstram uma resposta anormal em nível de mucosa intestinal, principalmente em pacientes sintomáticos graves, sugerindo uma deficiência imunológica primária ou secundária à infecção parasitária.

As diferenças na detecção de níveis de anticorpos observadas não só nesse estudo mas também pelas descrições literárias anteriormente citadas, denotam claramente que, fatos como a heterogeneidade dos indivíduos e estágios clínicos da doença são aspectos altamente relevantes nos casos de estrogiloidíase humana. A metodologia empregada no atual estudo não possibilitou a caracterização das amostras quanto ao estágio de infecção, no entanto, algumas colocações são necessárias. O desaparecimento de IgA específica, na maioria das infecções, é acompanhado por níveis estáveis de IgG, que por sua vez são detectadas posteriormente à IgA (ATKINS *et al.*, 1997). Acredita-se, pelos achados deste trabalho, que as amostras reativas representam indivíduos tanto de fase crônica (IgA – e IgG +) quanto aguda da infecção (IgA+ e IgG+), apesar da positividade para IgG sérica ser mais acentuada que IgA. No entanto, ao se trabalhar com resposta humoral, deve-se lembrar das variações imunológicas individuais, por isso a importância em se pesquisar diferentes classes de imunoglobulinas simultaneamente.

Com relação à secreção salivar, existe uma correlação entre os níveis de imunoglobulinas encontrados na mesma com o quadro odontológico dos indivíduos. Segundo Lehner (1996), a lesão inicial da gengivite é localizada no sulco gengival, no epitélio juncional e tecido conjuntivo adjacente. Os vasos sanguíneos da gengiva se dilatam e há exsudação de fluido com imunoglobulinas, principalmente IgG. Com base nesses comentários e diante da ausência de quadros clínicos odontológicos que pudessem alterar a resposta imunológica específica, imagina-se que a baixa positividade encontrada nos grupos II e III no ELISA indique provável

reatividade cruzada entre *S. stercoralis*, principalmente por pertencerem, a maioria, ao filo dos helmintos (COSTA-CRUZ; MACHADO; CAMPOS, 1998). Contudo, não deve ser descartada a possibilidade da existência de *S. stercoralis* em tais indivíduos, apesar do exame parasitológico negativo para os mesmos. Importante ressaltar que, no grupo I, apenas dois casos de gengivite e cáries leves foram detectados. Esses pacientes apresentaram-se positivos para as duas amostras, todavia não apresentaram acentuados valores de DO (densidade óptica). Os valores reforçam as citações de Lehner (1996), ao afirmar que as concentrações de IgAs na saliva total, somente são significativamente menores em indivíduos com lesões (cárie, gengivite, periodontite) acentuadas.

Ainda relacionado aos valores de positividade ELISA, um paciente do grupo I, apresentou elevado nível de IgG na amostra de saliva. O indivíduo pertencente ao sexo masculino era alcóolatra há 15 anos. Segundo Oliveira *et al.* (2002), alcoolátras crônicos são mais susceptíveis à infecções por *S. stercoralis* devido à maior exposição aos agentes infecciosos. Nesses indivíduos, ocorre acentuado aumento no nível de imunoglobulinas séricas, frequentemente IgA, IgM e IgG. Concluem que alcoolismo crônico é um importante fator que predispõe a estrogiloidíase.

Várias 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). Estudos apontam para uma aparente compartimentalização dos sistemas de mucosa e sistêmico. 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).

Quando o agente infectante é capaz de colonizar ou invadir a mucosa intestinal, ele não só induz a resposta imune local, como também, pelo contato com outros tecidos linfóides, pode desencadear resposta humoral através da síntese de IgM, IgA e IgG (McGHEE; MESTECKY, 1990).

Comparando-se os resultados dos testes RIFI e ELISA e analisando valores concordantes e discordantes, a RIFI para detecção de IgA na saliva, mostrou-se capaz de auxiliar o diagnóstico. Segundo Dafalla (1972), a RIFI é um teste eficaz, principalmente pelo fato de reconhecer antígenos de superfície .

Os acentuados valores de IgG no soro observados no ELISA, quando comparados aos encontrados na RIFI se assemelham aos relatos de Bueno *et al.* (2000) na neurocisticercose humana. Os autores encontraram, para IgG no soro 100% de positividade e 32% na saliva, porém, diferem para detecção de IgA no soro (36%) e 4% na saliva. Entretanto, foram observados por Loyola *et al.* (1997) maior positividade de IgG anti-*T. gondii* no soro (71,7%), 30% para IgA-soro e apenas 20% de positividade nas amostras de saliva para ambos anticorpos. Diferente de Pinho *et al.* (1999), que detectaram somente em amostras de saliva, 90,4% de IgG anti-*Trypanosoma cruzi*. Tais autores discutem que a heterogeneidade dos pacientes influencia no tipo de resposta imune humoral e a presença das imunoglobulinas é dependente do estágio da doença.

No presente estudo, resultados séricos encontrados para IgA e IgG pelos testes RIFI e ELISA, sugerem que o possível aumento dos níveis de IgG sejam acompanhados da diminuição nos níveis de IgA no soro.

A estimulação primária e secundária do tecido linfóide de mucosa requer grandes quantidades de antígeno e a sua permanência por maior tempo no sítio de estimulação (McGHEE; MESTECKY, 1990). Com base nisso, acredita-se que, a presença da IgA

específica nas amostras de saliva neste estudo, represente uma resposta a um contato recente com o parasito, uma primoinfecção ou reinfecção do parasito no hospedeiro.

Quanto ao achado de IgG específica anti-*S. stercoralis* na secreção salivar, nota-se que não ocorreu elevada correspondência entre os indivíduos com níveis séricos de reatividade para essa imunoglobulina.

Na saliva podem ser encontradas IgA e IgG monoméricas derivadas do soro via sulco gengival. Provavelmente, a baixa quantidade de IgG na saliva, neste trabalho, seja decorrente da ausência de problemas na cavidade oral dos pacientes, permitindo transudação insignificante deste anticorpo a partir do soro (GRONBLAD-SAKSELA, 1986). No entanto, quando seus valores séricos são observados pelo ELISA, percebe-se a utilidade nos estudos com IgG nos casos de estrogiloidiase, principalmente em estudos de populações endêmicas e cronicamente infectados (ATKINS *et al.*, 1997).

A elevada porcentagem de reatividade encontrada para IgA nas secreções salivares, bem como seus altos índices de concordância nos dois testes imunológicos, sugerem a utilização da saliva como fluido alternativo em testes imunológicos e em estudos epidemiológicos para pesquisa de IgA, que além de ser um marcador de fase recente da infecção pelo *S. stercoralis*, é de grande importância nos mecanismos de proteção sérica e em superfície de mucosas.

Considerando que o diagnóstico parasitológico para detecção de *S. stercoralis*, não raramente apresenta falhas, o presente estudo ressalta a importância da detecção de anticorpos das classes IgA e IgG em amostras séricas e em secreções salivares como diagnóstico auxiliar na estrogiloidiase humana, sobretudo em regiões endêmicas onde o estabelecimento do diagnóstico efetivo contribui para o precoce tratamento da infecção, evitando complicações.

6. CONCLUSÕES

- Os testes RIFI e ELISA associados para detecção de anticorpos IgA e IgG frente amostras de soro e saliva, são úteis para auxiliar o diagnóstico da estrogiloidíase.
- Na detecção de IgA anti-*Strongyloides* observou-se maior positividade, em amostras de saliva, pela RIFI e maiores valores de positividade foram observados para IgG, em amostras de soro, pelo ELISA.
- A saliva é indicada como fluido alternativo no diagnóstico da estrogiloidíase humana pela RIFI.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS⊕

- ANDRADE NETO, J. L.; ASSEF, M. C. V. Estrongiloidíase. In: VERONESI, R., FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 1373-1378.
- ATKINS, N. S.; LINDO, J. F.; LEE, M. G.; CONWAY, D. J.; BAILEY, J. W.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D.A.P. Humoral responses in human strongyloidiasis: correlations with infection chronicity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, p. 609-613, 1997.
- ATKINS, N. S.; CONWAY, D. J.; LINDO, J. F. BAILEY, J. W.; BUNDY, D. A P. L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlations with larval output. **Parasite Immunology**, v. 21, p. 517-526, 1999.
- BAERMANN, G. T. Eine einfache Methode zur Auffindung von Anksylostomun (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel. mit H. in. Geneesk. Batavia, **Laboratories Weltevreden Feestbundel**, p. 41-47, 1917.
- BRANDTZEG, P. The role of J chain and secretory component in receptor-mediated glandular and hepatic transport of immunoglobulin in man. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.22, p. 111, 1985.
- BUENO, E. C.; VAZ A. J.; MACHADO, L. R.; LIVRAMENTO, J. A. Detection of IgG, IgA and IgE antibodies in cerebrospinal fluid, serum and saliva samples by ELISA with *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* antigens. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v. 58, p. 18-24, 2000.
- CARRANZA, F. A .; NEWMAN, M. G. Mecanismos de defesa da gengiva. In: **Periodontia Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 108-115.
- CHAVES-BORGES, F. A.; MINEO, J. R. **Medidas de biossegurança em laboratórios**. Uberlândia: EDUFU (editora da UFU). 1997, 55p.
- CHICHARRO, J. L; PEREZ, M; VAGUERO, A. F; URENA, R. Saliva composition and exercise. **Sports Medicine**, v. 26, p. 17-27, 1998.

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 relative systems of immune defense? *Annals of the International of Medicine*, v. 106, p. 892-899, 1987.

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

COSTA-CRUZ, J. M.; MACHADO, E. R.; CAMPOS, D. M. B. Seroepidemiological study of human strongyloidiasis with samples collected on filter paper, in Abadia dos Dourados (Minas Gerais, Brasil). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 4, p. 329-331, 1998.

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

COSTA-CRUZ, J. M.; COSTA, I. N.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; BARCELOS, I. S. C.; CAMPOS, D. M.; FERREIRA, M. S. Detecção de imunoglobulina A pela reação ELISA na estromboloidíase humana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 16., 1999a, Poços de Caldas. Resumos...p. 35.

COSTA-CRUZ, J. M.; SILVA, L. P.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; CAMPOS, D. M. B. Detecção de imunoglobulina G pelo teste ELISA, utilizando extratos antigênicos salino e alcalino de *Strongyloides ratti* no diagnóstico da estromboloidíase humana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 16., 1999b, Poços de Caldas. Resumos...p. 129.

COUDERT, J.; AMBROISE-THOMAS, P.; KIEN TRUONG, T. H. A. I.; POTHEIR, M. A. Diagnostic sérologique de l'anguillulose humaine par immunofluorescence (resultats preliminaires). *Bulletim de la Societe Pathologie Exotique et de ses Filiales*, v. 61, p. 74-80, 1968.

DAFALLA, A. A. The indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of strongyloidiasis. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 75, p.100-109, 1972.

DELACROIX, D. L. L'immunoglobuline A em 1985. **Gastroenterology Clinical and Biology**, v. 9, p. 603-606, 1985.

DELACROIX, D. L.; DIVE, J. C.; RAMBAUD, J. C.; VAERMAM, J. P. IgA subclasses in various secretions and in serum. **Immunology**, v. 47, p. 383-385, 1982.

DREYER, G.; FERNANDES-SILVA, E.; ALVES, S.; ROCHA, A.; ALBUQUERQUE, R.; ADDISS, D. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens – Implications for diagnosis and clinical trials. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2569-2571, 1996.

FERREIRA, M. S. Estrongiloidíase. In: VERONESI, R., FOCACCIA, R., DIETZE, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 856-864.

FOGAÇA, H. S.; ELIA, C. C. S.; MADI, K.; OLIVEIRA, A. Estudo das imunoglobulinas intestinais na estrongiloidíase. **Folha Médica**, v. 100, p. 229-235, 1990.

GENTA, R. M.; GARY, J.; WEIL, M. D. Antibodies to *Strongyloides stercoralis* larval surface antigens in chronic strongyloidiasis. **Laboratory Investigation**, v. 47, p. 87-90, 1982.

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 New Series**, v. 68, p. 679-690, 1988.

GRIMOUD, A.; PONTEL, F.; ARMAUD, C.; DUFFAUT, D.; LODTER, J. P. Dialogue avec le praticien. Dosages de protéines dans la salive: méthodologie. **Option/Biology**, v. 156, p. 1-8, 1996.

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 stercoralis* larval surface antigens in chronic strongyloidiasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 344-349, 1981.

GRONBLAD-SAKSELA, E. Origin of immunoglobulin in human saliva. **Proceedings of the Finnish Dental Society**, v. 82, suppl. 5-6, p. 1-36, 1986.

HEREMANS, J. F.; HEREMANS, M. T.; SCHULTZE, H. E. Isolation and description of the few properties of the β_2 A-globulin of human serum. **Clinical Chemical Acta**, v. 4, p. 96-115, 1959.

LAMM, M. E. Celular aspects of immunoglobulin A. **Advances in Immunology**, v. 22, p. 223-290, 1976.

LEHNER, T. Imunologia da doença cárie. In: **Imunologia das doenças da boca**. Rio de Janeiro: Santos, 1996. p. 68-101.

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

LOWRY, V. 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.

LOYOLA, A. M.; DURIGHETO, A. F.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R. Anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulins A and G in human saliva and serum. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 26, p. 87-191, 1997.

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

MACHADO, E. R.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city State of Minas Gerais, Brazil, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.39, p.156-161, 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.

MADALENA, J. **Determinação de IgE específica e total por ELISA em amostras de soro na estrogiloidíase humana**. 1999. Monografia (conclusão de curso de Ciências Biológicas)-Universidade Federal de Uberlândia, Orientador: Julia M. Costa-Cruz.

McGHEE, J. R.; MESTECKY, J. Em defesa das superfícies de mucosa: desenvolvimento de novas vacinas para respostas protetoras de IgA em portas de entrada dos patógenos microbianos. **Clínica de Doenças Infecciosas da América Norte**, p. 303-328, 1990.

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.

MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, v. 1, p. 507-524, 1948.

MURO, R.; ACOSTA, E.; MERINO, E.; GLENDER, W.; ORTIZ-ORTIZ, L. Diagnosis of intestinal amebiasis using salivary IgA antibody detection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 162, p. 360-364, 1990.

NAGESWARON, C.; CRAIG, P. S.; DEVANEY, E. Coproantigen detection in rats experimental infected with *Strongyloides ratti*. **Parasitology**, v. 108, p. 335-342, 1994.

NEVES, D. P. Exames parasitológicos de fezes. In **Parasitologia Humana**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000. p. 403-411.

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

ONUIGBO, M. A. C.; IBEACHUM, G. I. *Strongyloides stercoralis* larvae in peripheral blood. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 97, 1991.

PARRY, J. V. Simple and reliable salivary tests for HIV and hepatitis A and B virus diagnosis and surveillance. **Annals New York Academy of Sciences**, p. 216-233, 1993.

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

PÊSSOA, S. B.; MARTINS, A. V. Superfamília Rhabdisoidea-*Strongyloides stercoralis* e estrogiloidose. In: **Parasitologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p. 507-515.

PINHO, R. T.; PEDROSA, R. C.; COSTA-MARTINS, P.; CASTELLO-BRANCO, L. R. R. Saliva ELISA: a method for the diagnosis of chronic Chagas disease in endemic areas. **Acta Tropica**, v. 72, p. 31-38, 1999.

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

REY, L. *Strongyloides stercoralis* e estrogiloidíase. In: **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 581-590.

ROSSI, C. L.; TAKAHASHI, E. E.; 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. 16, p. 83-87, 1993a.

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

RÚPOLO, B. S.; MIRA, J. G. S.; KANTOR JUNIOR, O. Deficiência de IgA. **Jornal de Pediatria**, v. 74, p. 433-440, 1998.

SALVI, S.; HOLGATE, S. T. Could the airway epithelium play an important role in mucosal immunoglobulin A production? **Clinical and Experimental Allergy**, v. 29, p. 1597-1605, 1999.

SANCHEZ-MARTIN, J. R.; CARDAS, J.; AHEDO, L.; FANO, E.; ECHEBARRIA, A.; AZPIROZ, A. Social behavior, cortisol, and sIgA levels in preschool children. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 50, p. 221-227, 2001.

SATO, Y.; KOBAYASHI, J.; SHIROMA, Y. Serodiagnosis of strongyloidiasis the application and significance. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, p. 35-41, 1995.

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

SMITH, A. M.; BOWEN, W. H. In situ studies of pellicle formation on hidroxyapatite discs. **Archives of Oral Biology** , v. 45, p. 277-291. 2000.

Anexo 1

Relação dos 48 pacientes com estrogiloidiase (grupo I) segundo sexo, idade, procedência e diagnóstico imunológico pela Reação Imunofluorescência Indireta (título) e ELISA (índice ELISA - IE) na detecção de IgA e IgG em amostras de soro e saliva

CASO	SIGLA	SEXO	IDADE (ANOS)	PROCEDÊNCIA	IgA - Soro		IgA - Saliva		IgG - Soro		IgG - Saliva	
					RIFI	ELISA	RIFI	ELISA	RIFI	ELISA	RIFI	ELISA
1	ABC	F	18	Uberlândia	Neg	77,9	Neg	42,8	Neg	51,5	Neg	36,5
2	ACS	M	61	Uberlândia	Neg	96,9	2	141,5	20	135,8	2	125,0
3	AJM	M	75	Uberlândia	10	241,5	2	83,0	40	175,0	2	67,3
4	ALMC	M	21	Uberlândia	Neg	157,1	8	61,1	20	124,1	2	42,3
5	ALTC	F	26	Uberlândia	10	99,1	Neg	80,7	40	191,3	Neg	110,6
6	ANS	F	13	Uberlândia	Neg	126,2	2	102,6	Neg	101,5	Neg	57,7
7	BMNS	F	28	Uberlândia	10	108,5	4	60,5	20	41,0	Neg	50,0
8	DMOC	F	32	Uberlândia	10	191,5	2	115,0	20	188,3	2	201,9
9	DS	F	20	Uberlândia	Neg	78,9	Neg	34,3	20	166,9	Neg	195,2
10	EBR	M	39	Uberlândia	10	146,6	8	131,4	40	156,0	2	132,7
11	ECC	M	54	Uberlândia	10	111,6	2	111,1	20	146,1	2	76,9
12	EMS	F	21	Uberlândia	10	128,9	2	142,8	40	212,0	4	132,7
13	ES	F	38	Uberlândia	10	86,7	Neg	53,9	20	75,0	Neg	26,0
14	FL	M	65	Uberlândia	40	119,7	Neg	134,0	40	151,5	Neg	108,7
15	HSM	M	71	Uberlândia	Neg	89,5	Neg	85,0	20	125,0	Neg	42,3
16	ILRS	F	02	Uberlândia	Neg	33,3	2	34,3	Neg	57,8	2	105,8
17	IOM	F	43	Uberlândia	10	169,7	4	159,8	40	224,7	Neg	64,4
18	JA	M	43	Uberlândia	Neg	111,6	Neg	74,8	20	183,1	Neg	54,8
19	JAF	F	47	Uberlândia	Neg	142,2	4	60,1	20	66,6	Neg	48,1
20	JCR	M	20	Araguari	Neg	110,2	Neg	65,7	20	209,3	Neg	67,3
21	JL	M	05	Uberlândia	Neg	92,9	Neg	42,5	Neg	92,2	Neg	48,1
22	JLI	M	49	Uberlândia	Neg	72,4	2	87,3	Neg	52,4	2	85,6
23	JLM	M	10	Uberlândia	10	69,6	2	59,2	Neg	57,5	2	64,4
24	JVR	F	17	Araguari	10	125,9	4	334,3	80	237,0	2	50,0
25	LBR	M	58	Uberlândia	10	246,9	2	100,7	20	218,1	Neg	57,7
26	LH	M	70	Uberlândia	10	178,6	2	107,5	20	197,0	2	100,0
27	LHAR	F	59	Araguari	10	131,6	4	28,1	Neg	118,4	Neg	28,8
28	LMG	F	19	Uberlândia	Neg	122,1	2	47,4	40	225,0	Neg	100,0
29	LRO	F	65	Uberlândia	20	202,0	2	151,6	Neg	101,2	Neg	38,5
30	MC	F	28	Araguari	Neg	120,7	8	87,3	Neg	82,2	Neg	49,0
31	MFO	M	59	Uberlândia	Neg	126,9	2	119,3	20	108,4	Neg	66,3
32	MIBS	F	32	Araguari	10	106,9	2	184,3	20	167,5	Neg	75,0
33	MRPJ	F	54	Uberlândia	Neg	151,7	Neg	177,8	20	124,4	Neg	201,0
34	NAS	M	40	Uberlândia	Neg	154,1	2	34,6	20	142,8	Neg	46,2
35	OMM	M	71	Uberlândia	10	317,3	2	102,6	20	185,8	2	104,3
36	PCS	M	39	Uberlândia	10	184,0	2	464,1	40	153,3	2	1039,4
37	PHS	M	02	Uberlândia	Neg	34,7	4	41,2	Neg	27,4	Neg	45,2
38	PP	M	39	Araguari	Neg	76,9	Neg	77,5	20	121,7	2	132,7
39	PRR	M	56	Uberlândia	10	121,1	2	100,7	20	215,1	Neg	94,2
40	RPM	F	33	Uberlândia	Neg	189,1	2	264,4	20	128,3	Neg	98,1
41	RSF	M	39	Uberlândia	20	98,3	2	166,7	20	133,1	Neg	39,4
42	SM	F	42	Uberlândia	Neg	68,7	4	42,8	Neg	111,1	2	88,5
43	SP	F	13	Araguari	10	162,6	2	65,0	20	157,8	Neg	88,5
44	SRP	F	47	Uberlândia	20	110,9	4	119,9	20	107,8	Neg	65,4
45	TSP	F	24	Tupaciguara	10	106,5	2	67,0	20	175,6	Neg	76,0
46	VAF	F	17	Uberlândia	10	103,1	Neg	77,1	Neg	72,3	Neg	50,0
47	VMS	F	65	Araguari	Neg	54,5	2	118,6	Neg	108,4	Neg	61,5
48	VSO	M	44	Araguari	Neg	78,9	Neg	67,6	Neg	112,0	Neg	64,4

M: sexo masculino; F: sexo feminino; Neg: resultado negativo.

Anexo 2

Relação dos 35 pacientes com outras parasitoses (Grupo II), segundo sexo, idade, procedência, diagnóstico parasitológico e imunológico pela RIFI (título) e ELISA (índice ELISA – IE) na detecção de IgA e IgG em amostras de soro e saliva

CASO	SIGLA	SEXO	IDADE (ANOS)	PROCEDÊNCIA	PARASITO	IgA Soro		IgA Saliva		IgG Soro		IgG Saliva	
						RIFI	ELISA	RIFI	ELISA	RIFI	ELISA	RIFI	ELISA
1	ACJ	M	07	Uberlândia	<i>G. lamblia</i>	Neg	15,6	Neg	61,4	Neg	40,4	Neg	88,5
2	BPS	M	08	Uberlândia	Ancilostomídeo	Neg	44,6	Neg	46,8	Neg	110,9	Neg	59,6
3	DAC	F	08	Uberlândia	<i>A. lumbricoides</i>	Neg	38,8	Neg	99,4	Neg	81,0	Neg	41,7
4	DF	M	11	Uberlândia	Ancilostomídeo	Neg	29,6	Neg	43,6	Neg	92,2	Neg	32,1
5	DGS	M	14	Uberlândia	<i>A. lumbricoides</i>	Neg	43,9	Neg	73,4	Neg	44,6	Neg	125,6
6	DRS	F	09	Tupaciguara	<i>A. lumbricoides</i>	Neg	28,2	Neg	53,2	Neg	91,0	Neg	31,4
7	FGB	M	07	Uberlândia	<i>G. lamblia</i>	Neg	61,2	Neg	99,1	Neg	62,7	Neg	47,0
8	GAP	M	10	Uberlândia	<i>G. lamblia</i>	Neg	49,7	Neg	88,6	Neg	66,9	Neg	28,2
9	HAR	M	10	Uberlândia	<i>G. lamblia</i>	Neg	39,5	Neg	81,9	Neg	66,9	Neg	88,5
10	IJS	F	11	Uberlândia	<i>G. lamblia</i>	Neg	26,9	Neg	87,7	Neg	33,7	Neg	34,6
11	JPS	F	10	Uberlândia	<i>E. vermicularis</i>	Neg	42,2	Neg	88,9	Neg	94,0	Neg	19,2
12	JS	F	25	Araguari	<i>Taenia</i> sp	Neg	69,4	Neg	81,9	Neg	30,4	Neg	67,1
13	KGS	M	08	Tupaciguara	<i>G. lamblia</i>	Neg	83,0	Neg	56,4	Neg	73,5	Neg	55,1
14	LFS	M	14	Uberlândia	<i>A. lumbricoides</i>	Neg	46,9	Neg	100,0	Neg	61,4	Neg	34,0
15	LM	M	08	Uberlândia	<i>G. lamblia</i>	Neg	60,9	Neg	76,9	Neg	94,0	Neg	39,1
16	LPS	F	59	Uberlândia	<i>E. histolytica</i>	Neg	91,5	Neg	56,1	Neg	64,8	Neg	34,0
17	LS	M	08	Uberlândia	<i>G. lamblia</i>	Neg	75,5	Neg	81,0	Neg	85,5	Neg	34,6
18	LSS	M	09	Uberlândia	<i>G. lamblia</i>	Neg	68,4	Neg	70,2	Neg	76,8	Neg	34,0
19	MAS	M	05	Tupaciguara	<i>G. lamblia</i>	Neg	62,2	Neg	81,9	Neg	61,1	Neg	88,5
20	MG	F	12	Uberlândia	Ancilostomídeo	Neg	48,3	Neg	50,3	Neg	52,1	Neg	26,9
21	ML	F	09	Uberlândia	Ancilostomídeo	Neg	56,5	Neg	121,1	Neg	45,5	Neg	49,4
22	MMR	F	07	Tupaciguara	<i>A. lumbricoides</i>	Neg	63,6	Neg	41,5	Neg	50,4	Neg	30,2
23	MPS	F	62	Uberlândia	<i>E. histolytica</i>	Neg	125,9	Neg	88,9	Neg	63,6	Neg	29,5
24	MSD	M	07	Uberlândia	<i>A. lumbricoides</i>	Neg	57,1	Neg	59,1	Neg	59,9	Neg	63,5
25	MV	M	12	Uberlândia	<i>A. lumbricoides</i>	Neg	52,7	Neg	59,1	Neg	59,9	Neg	57,7
26	NC	F	52	Araguari	<i>A. lumbricoides</i>	Neg	101,4	Neg	87,1	Neg	76,5	Neg	45,0
27	RCD	F	14	Uberlândia	<i>E. vermicularis</i>	Neg	53,1	2	86,0	Neg	50,6	Neg	69,6
28	SDRP	F	40	Uberlândia	<i>Taenia</i> sp	Neg	62,2	Neg	95,0	Neg	51,6	Neg	35,3
29	SMM	F	31	Araguari	<i>T. trichiura</i>	Neg	61,2	Neg	81,9	Neg	40,0	Neg	32,9
30	TMS	F	10	Araguari	<i>G. lamblia</i>	Neg	69,0	Neg	48,2	Neg	59,6	Neg	25,5
31	TS	M	08	Uberlândia	Ancilostomídeo	Neg	36,7	Neg	72,8	Neg	52,1	Neg	19,9
32	TS	M	08	Uberlândia	<i>A. lumbricoides</i>	Neg	33,7	Neg	60,8	Neg	35,8	Neg	31,4
33	VFS	M	10	Uberlândia	<i>T. trichiura</i>	Neg	38,4	Neg	98,5	Neg	63,3	Neg	35,9
34	VLRS	F	25	Uberlândia	<i>E. histolytica</i>	Neg	94,2	Neg	102,6	Neg	54,2	Neg	37,2
35	WSD	M	10	Uberlândia	<i>E. vermicularis</i>	Neg	51,0	Neg	133,6	Neg	109,3	Neg	57,7

M: sexo masculino; F: sexo feminino; Neg: resultado negativo.

Anexo 3

Relação dos 35 indivíduos copronegativos (grupo III) segundo sexo, idade, procedência, diagnóstico parasitológico (métodos de Baermann – Moraes e Lutz) e imunológico pelos testes de RIFI (título) e ELISA (índice ELISA – IE) na detecção de IgA e IgG em amostras de soro e saliva

CASO	SIGLA	SEXO	IDADE (ANOS)	PROCEDÊNCIA	PARASITOLÓGICO	IgA Soro		IgA Saliva		IgG Soro		IgG Saliva	
						RIFI	ELISA	RIFI	ELISA	RIFI	ELISA	RIFI	ELISA
1	ACP	F	24	Uberlândia	Neg	Neg	78,5	Neg	51,9	Neg	55,1	Neg	90,0
2	AMA	F	01	Uberlândia	Neg	Neg	83,3	Neg	83,1	Neg	40,5	Neg	56,3
3	AMR	M	05	Uberlândia	Neg	Neg	55,8	Neg	21,2	Neg	25,9	Neg	24,7
4	APM	M	24	Uberlândia	Neg	Neg	97,5	Neg	83,1	Neg	40,7	Neg	98,9
5	CBC	M	21	Uberlândia	Neg	Neg	57,1	Neg	74,5	Neg	53,1	Neg	39,4
6	CJC	M	21	Uberlândia	Neg	Neg	57,8	Neg	71,1	Neg	42,5	Neg	28,3
7	CVS	F	22	Uberlândia	Neg	Neg	57,6	Neg	52,1	Neg	27,2	Neg	36,6
8	DAF	F	24	Uberlândia	Neg	Neg	32,7	Neg	22,9	Neg	36,0	Neg	24,0
9	DVDB	F	25	Uberlândia	Neg	Neg	52,6	Neg	75,9	Neg	58,0	Neg	97,5
10	FCB	M	25	Uberlândia	Neg	Neg	78,6	Neg	42,1	Neg	44,2	Neg	78,1
11	FCS	F	24	Uberlândia	Neg	Neg	78,0	Neg	44,7	Neg	55,3	Neg	67,4
12	FRF	M	25	Uberlândia	Neg	Neg	75,3	Neg	43,6	Neg	40,0	Neg	58,8
13	GAM	F	26	Uberlândia	Neg	Neg	82,7	Neg	40,7	Neg	44,2	Neg	81,7
14	HMSB	F	25	Uberlândia	Neg	Neg	99,8	Neg	78,8	Neg	33,3	Neg	84,6
15	IAS	M	10	Uberlândia	Neg	Neg	47,2	Neg	97,1	Neg	52,3	Neg	57,7
16	IDA	F	66	Uberlândia	Neg	Neg	78,4	Neg	91,1	Neg	45,2	Neg	41,6
17	JAL	F	25	Uberlândia	Neg	Neg	78,4	Neg	91,1	Neg	45,2	Neg	41,6
18	JJS	M	25	Uberlândia	Neg	Neg	98,2	Neg	58,2	Neg	17,3	Neg	48,7
19	JM	F	22	Uberlândia	Neg	Neg	98,2	Neg	58,2	Neg	17,3	Neg	48,7
20	LAS	M	10	Uberlândia	Neg	Neg	83,3	Neg	43,6	Neg	22,7	Neg	35,1
21	MCS	F	35	Uberlândia	Neg	Neg	83,3	Neg	43,6	Neg	22,7	Neg	35,1
22	MIRR	F	35	Uberlândia	Neg	Neg	45,4	Neg	48,7	Neg	29,1	Neg	97,5
23	MMN	F	46	Uberlândia	Neg	Neg	45,4	Neg	48,7	Neg	29,1	Neg	97,5
24	MRB	M	22	Uberlândia	Neg	Neg	69,7	Neg	90,8	Neg	87,2	Neg	38,4
25	PMVP	M	24	Uberlândia	Neg	Neg	69,7	Neg	90,8	Neg	87,2	Neg	38,4
26	PSS	F	23	Uberlândia	Neg	Neg	84,0	Neg	38,4	Neg	37,8	Neg	45,5
27	RBF	M	26	Uberlândia	Neg	Neg	84,0	Neg	38,4	Neg	37,8	Neg	45,5
28	RCC	F	25	Uberlândia	Neg	Neg	86,9	Neg	77,4	Neg	33,1	Neg	98,6
29	RKRF	F	19	Uberlândia	Neg	Neg	86,9	Neg	77,4	Neg	33,1	Neg	98,6
30	RMR	F	27	Uberlândia	Neg	Neg	75,1	Neg	56,7	Neg	38,5	Neg	29,4
31	RMS	F	25	Uberlândia	Neg	Neg	75,1	Neg	56,7	Neg	38,5	Neg	29,4
32	RSR	F	23	Uberlândia	Neg	Neg	84,7	Neg	83,1	Neg	69,1	Neg	69,2
33	SVR	F	06	Uberlândia	Neg	Neg	84,7	Neg	83,1	Neg	69,1	Neg	69,2
34	SVR	F	04	Uberlândia	Neg	Neg	104,8	Neg	54,4	Neg	29,1	Neg	90,0
35	TFO	F	34	Uberlândia	Neg	Neg	104,8	Neg	54,4	Neg	29,1	Neg	90,0

M: sexo masculino; F: sexo feminino; Neg: resultado negativo.