

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

**DETERMINAÇÃO DE IgE ESPECÍFICA E TOTAL POR
ELISA EM AMOSTRAS DE SOROS NA
ESTRONGILOIDÍASE HUMANA**

JOAQUINA MADALENA

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

Uberlândia - MG
Novembro- 1999

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

**DETERMINAÇÃO DE IgE ESPECÍFICA E TOTAL POR
ELISA EM AMOSTRAS DE SOROS NA
ESTRONGILOIDÍASE HUMANA**

JOAQUINA MADALENA

Prof^a Dr^a JULIA MARIA COSTA-CRUZ
Orientadora

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

Uberlândia - MG
Novembro- 1999

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

**DETERMINAÇÃO DE IgE ESPECÍFICA E TOTAL POR
ELISA EM AMOSTRAS DE SOROS NA
ESTRONGILOIDÍASE HUMANA**

JOAQUINA MADALENA

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 10/11/99

Nota 100

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

Julia Maria Costa Cruz
Orientadora: Profª Drª Julia Maria Costa-Cruz
Membro nato da banca examinadora

Ernesto Akio Taketomi
Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Segundo membro da banca examinadora

Maria José Santos Mundim
Profª Maria José Santos Mundim
Terceiro membro da banca examinadora

Uberlândia, 10 de novembro de 1999.

MENSAGEM

*"Gostaria de ajudar.
Todos nós desejamos ajudar uns aos outros.
Os seres humanos são assim.
Desejamos viver para felicidade do próximo e não
para seu infortúnio.
Por que havemos de odiar e desprezar uns aos outros
?
Neste mundo há espaço para todos.
Portanto em nome da democracia unamo-nos
todos.
Lutemos por um mundo novo...
Precisamos de humanidade, precisamos de afeição e
doçura...
Um mundo bom que a todos assegure o ensejo de
trabalho, que dê futuro à necessidade e segurança
à velhice".*

Charles Chaplin- O Último Discurso

DEDICO

A DEUS que com incomparável e inconfundível bondade, compreendeu os meus anseios e me deu coragem para vencer mais essa etapa de minha longa caminhada, e por estar presente em todos os momentos.

Meus pais por terem me dado a vida e me ensinado a viver com dignidade, amor e respeito.

As minhas filhas, a minha afilhada, aos meus irmãos, a Bela, pela oportunidade de fazer honrar todo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis, com a mais profunda gratidão amor e respeito.

Ao Mitó que com respeito soube, a cada momento compreender minhas ausências e me deu força para superar todos obstáculos dando-me carinho e a certeza de ser amada.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a Dr^a Julia Maria Costa-Cruz, pela confiança em meu trabalho, pelo carinho dedicação, paciência e principalmente pelo exemplo de profissionalismo, fatores que durante esses anos de parceria, sem dúvida tiveram uma imensa contribuição no meu crescimento pessoal, espírito crítico e formação científica.

Ao Prof. Dr Ernesto Akio Taketomi,, por ter aceito contribuir no enriquecimento desse trabalho.

A Prof^a Maria José Santos Mundim pela ajuda e troca de conhecimento.

A Deise. A O Silva,, Mônica C. Soplete, pela paciência e constante dedicação na realização deste trabalho. Aprendi muito com vocês. Muito obrigada.

A Maria do Rosário, Solange, Kely, Gresce, Selma, Fabiana, Luciana, Graça, pela presença constante, atenção e presteza sempre que precisei.

A Eliete, por dedicar horas de seu tempo em auxílio à este trabalho pelas conversas agradáveis, carinho e brilhantes exemplos de vida.

As colegas Gleice, Idessania, Nayara Daniela, pela alegria e amizade.

As amigas Mireilly Marques, Cristiane dos Santos, Elisa, pelo aconhego familiar pelas conversas descontraídas e participação nos momentos de alegria e dificuldades.

Aos técnicos do Laboratório de Parasitologia e Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia e do laboratório de análises clínicas do HC-UFU, pela compreensão e ajuda na realização deste trabalho.

Ao Dr Lino, pela "força inicial", receptividade e atenção.

Aos amigos João, Francisco, José Carlos, Manuel, Juliano, Anzol, pelo convívio, troca de ideias, conselhos sinceridades, momentos difíceis e muitos momentos felizes.

Aos amigos general José Maria, brigadeiro Coseiro, que muito contribuíram para a minha formação profissional e humana.

As secretarias e Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, pelo estímulo nos momentos de dificuldades.

A todos que direto ou indiretamente ajudaram-me na realização deste trabalho.

Aos amigos professores que encontrei ao longo desses anos na Universidade com os quais muito aprendi.

Aos amigos invisíveis por tentar sempre nos instruir para os valores nobres que a vida oferece.

OBRIGADA

RESUMO

O teste ELISA tem sido utilizado para investigar a presença de imunoglobulinas no soro contra larvas de *Strongyloides stercoralis*. Entretanto, uma das principais limitações encontradas na padronização de testes sorológicos mais sensíveis e específicos é a dificuldade em se obter quantidade suficiente de antígenos homólogos que permitam seu posterior fracionamento e análise. Este trabalho teve como objetivos determinar níveis de IgE específica e total por ELISA em amostras de soros, utilizando como antígeno heterólogo larvas filarióides de *S. ratti* para o diagnóstico da estrongiloidíase humana. Amostras de soros de 120 indivíduos foram analisadas, sendo 40 pacientes que eliminavam larvas de *S. stercoralis* nas fezes (grupo I), 40 pacientes com outras parasitoses, triados pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFU-MG (grupo II) e 40 indivíduos sadios, estudantes universitários, parasitologicamente negativos pelos métodos de Baermann-Moraes e Hoffmann, Pons e Janer em três amostras fecais (grupo III). *S. ratti* foi obtido de cultura de fezes de *Rattus rattus* infectados experimentalmente. Microplacas para ELISA foram sensibilizadas com 0,5µg/poço de extrato salino de *S. ratti*. Amostras de soro foram utilizadas na diluição de 1:2 em duplicata e o anticorpo secundário anti-IgE humana-biotinilado a 1:1000. O conjugado consistiu de estreptavidina-peroxidase a 1:1000 e a revelação com ABTS e H₂O₂. Resultados foram expressos em Índices ELISA (IE), considerando valor de *cut off* = 100. ELISA para IgE total utilizou anticorpo monoclonal de captura anti-IgE humana (1:5000), soros nas diluições de 1:5, 1:25 e 1:125, o conjugado estreptavidina-peroxidase (1:4000) e as etapas subseqüentes foram as mesmas para ELISA-IgE específica. Resultados foram expressos em U/ml (limiar de normalidade = 100U/ml). A média geométrica (m.g.) dos níveis de IgE específica a *S. stercoralis* obtidos por ELISA foi significativamente maior no grupo I (IE 143 $p < 0,05$) do que nos grupos II (IE 70) e III (IE 76), apresentando assim positividade de 55% (22/40) nos pacientes com exame parasitológico positivo, apenas 2,5% (1/40) nos pacientes com outras parasitoses e 17,5% (7/40) nos indivíduos sadios. Níveis de IgE total foram significativamente maiores para o grupo I (m.g. 866 U/ml, $p < 0,05$) em relação aos grupos II e III (302 e 313 U/ml, respectivamente). Por outro lado, a positividade não revelou diferenças estatisticamente significativas nos três grupos (77,5%, 67,5% e 70%, respectivamente). Houve significante correlação positiva entre os níveis de IgE específica a *S. stercoralis* nos pacientes do grupo I e IgE total. Concluiu-se que não houve diferença significativa na positividade de IgE total entre os diferentes grupos estudados, apesar de se ter encontrado níveis maiores no grupo de pacientes com presença de larvas de *S. stercoralis*. Por outro lado, os níveis de IgE específica bem como a positividade no grupo de pacientes positivos para *S. stercoralis* foram bem superiores aos dos grupos com outras parasitoses ou de indivíduos sadios. Portanto, acredita-se que o teste ELISA para IgE específica possa ter valor como auxílio ao diagnóstico e monitoramento da resposta imune da estrongiloidíase humana. Este trabalho vem descrever de forma pioneira a utilização de antígeno heterólogo para detecção de IgE específica a *S. stercoralis* por ELISA.

Palavras chaves: *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides ratti*, Estrongiloidíase ELISA, IgE.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

2. OBJETIVOS	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Obtenção de <i>Strongyloides ratti</i>	9
3.1.1 Método de Looss	9
3.1.2 Método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948)	10
3.2 Produção do extrato salino de <i>S. ratti</i>	10
3.3 Amostras de soros	10
3.3.1 Amostras de soros de pacientes com estrongiloidíase (Grupo I)	11
3.3.2 Amostras de soros de pacientes com outras parasitoses (Grupo II)	11
3.3.2.1. Método de Hoffmann, Pons e Janer	11
3.3.3 Amostras de soros controles de indivíduos sadios (Grupo III)	12
3.3.4 Amostras de soros controles positivo e negativo.	12
3.4 Testes imunoenzimáticos	13
3.4.1 Teste ELISA para a detecção de IgE específica de <i>S. stercoralis</i> utilizando extrato salino de <i>S. ratti</i>	13
3.4.2 Teste ELISA para a detecção dos níveis séricos de IgE total	13
3.5 Análise estatística	14
3.6 Normas de biossegurança	14
4. RESULTADOS	15
4.1. Obtenção de <i>Strongyloides ratti</i>	15
4.2. Produção de extrato salino de <i>S. ratti</i>	15
4.3. Identificação das amostras de soros testados	15
4.4. Níveis séricos de IgE específica anti- <i>S. stercoralis</i>	15
4.5. Níveis de IgE sérica total	16
4.6. Correlação entre os níveis de IgE total e específica a <i>S. stercoralis</i>	17
5. DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO	27
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*	28
8. ANEXO	36

INTRODUÇÃO

A estrogiloidíase é uma doença parasitária de distribuição mundial que ocupa o quinto lugar dentre as helmintíases, com estimativa de 35 milhões de indivíduos infectados, principalmente em países tropicais e subtropicais. A importância clínica decorre de sua capacidade única entre os nematódeos de invadir tecidos extra-intestinais levando a quadros graves, potencialmente fatais em indivíduos imunodeprimidos (BOUREE *et al.*, 1981; ANDRADE-NETO, ASSEF, 1997).

O parasita *Strongyloides* sp. pertence ao Filo Nematoda, Classe Secernentasida, Ordem Rhabdiorida. A família Strongyloididae é composta por apenas um gênero *Strongyloides* que apresenta 52 espécies (LEVINE, 1979). O homem pode ser acometido por duas delas: *S. stercoralis* e *S. fuelleborni*. A primeira espécie tem distribuição mundial, a segunda é encontrada na África e nas Filipinas (BARNISH, ASHFORD, 1989). Uma sub espécie foi descoberta parasitando o homem *S. f. bellyi* encontrada na Ilha da Nova Guiné (PIRES, DREYER, 1993).

O nematelminto *S. stercoralis* foi descoberto em 1876 pelo médico Francês Louis Normand, na cidade de Toulon-França, ao examinar fezes diarreicas de soldados procedentes da Cochinchina, atualmente Vietnã. As formas do parasita foram descritas por Bavay em 1876, como *Anguillula stercoralis* para parasitas encontradas na fezes e como *Anguillula intestinalis* para os obtidos em necrópsia. Em 1911, Leuckart demonstrou serem as formas *stercoralis* e *intestinalis* pertencentes à mesma espécie heterogenética, a fêmea partenogenética e outra de geração de vida livre bissexuada, passando a denominá-la *S. stercoralis* (PÊSSOA, MARTINS, 1982).

A fêmea partenogenética vive mergulhada na cripta da mucosa duodenal, principalmente nas glândulas de Lieberkühn e porção superior do jejuno. Apresenta corpo cilíndrico, filiforme, branco com extremidades afiladas medindo cerca de 2,2 mm de comprimento. Possui boca pequena, esôfago estreito e cilíndrico; a vulva situa-se no terço posterior do parasita, da qual se origina um útero divergente (anfidelfo); cada ramo possui quatro ou cinco ovos, que são expulsos já contendo a larva dentro (ovovivíparo) (GOMES MORALES *et al.*, 1995).

Assim que a fêmea expulsa o ovo embrionado, a larva rabditóide eclode, ainda na luz do duodeno. Dessa forma, nas fezes encontra-se a larva, que mede cerca de 200 micrômetros, possui esôfago tipicamente rabditóide, com dilatação nas extremidades e constrição na porção mediana. A capacidade deste parasito de causar auto-infecção permite que as larvas rabditóides na luz intestinal, se transformem em larvas filarióides e penetrem na mucosa intestinal, atingindo vasos sanguíneos e linfáticos possibilitando a disseminação por todo o organismo do hospedeiro. A sintomatologia baseia-se nas alterações produzidas pelas fêmeas partenogenéticas e pelas larvas (GROVE, 1996).

Esse helminto apresenta dois ciclos evolutivos, ambos monoxênicos: o primeiro é o direto ou partenogenético, no qual as larvas rabditóides chegam ao exterior junto com as fezes. Sendo depositadas em terrenos arenosos, com umidade alta e temperatura variável de 25 a 30°C, as larvas rabditóides transformam-se em larvas filarióides infectantes, em 24-72 horas. O segundo é de vida livre, sexuado ou indireto, no qual as larvas rabditóides eliminadas chegam ao exterior junto com as fezes e, alcançando o solo, com condições adequadas transformam-se em machos e fêmeas de vida livre. O macho de vida livre mede cerca de 0,7mm, possui esôfago rabditóide, cauda recurvada ventralmente, com dois espículos. A fêmea de vida livre, mede cerca de 1,5 mm, possui esôfago rabditóide, vulva na região mediana com útero anfidelfo repleto de ovos. Após a cópula a fêmea inicia a oviposição (NEVES *et al.*, 1995).

A estrongiloidíase pode causar diversos quadros clínicos de gravidade variável. Os hospedeiros imunocompetentes e infectados com baixa carga parasitária, são geralmente assintomáticos. As observações acumuladas, há cerca de 10 anos, de uma série de casos graves e fatais de helmintose, induzidos por corticosteróides e/ou terapêutica imunossupressora, utilizada particularmente para o tratamento de doenças malignas e nefropatias, revelaram interessante "modelo" da exacerbação de uma infecção latente, muitas vezes assintomática, permitindo avaliar a possível importância dos mecanismos imunológicos na manutenção do estado de equilíbrio parasita hospedeiro (GOMES, 1981).

A patogenia da doença está ligada a vários fatores tais como carga parasitária adquirida, estado nutricional e a resposta imunitária do indivíduo. Porém, em infecções maciças há o aparecimento de sintomas que podem ou não levar o indivíduo a óbito. Nos pacientes imunodeprimidos, podem causar hiperinfecção com sintomas graves e na falta de diagnóstico correto o indivíduo pode evoluir para a morte (MILDER *et al.*, 1981; PIRES, DREYER, 1993; CONWAY *et al.*, 1995).

Esta helmintose apresenta distribuição mundial heterogênea. Foram definidas três regiões mundiais de acordo com a prevalência da infecção: esporádica (<1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%) STUERCHLER (1981). Em Bangladesh, Índia, HALL *et al.*, (1994). detectaram prevalência de 11,6% para *S. stercoralis* em crianças na faixa etária de 7 a 10 anos. Em Basrah, Iraq, MAHDI *et al.*, (1993), observaram que 64% dos pacientes analisados estavam infectados com parasitas intestinais, sendo que 4,5% apresentaram *S. stercoralis* nas fezes examinadas pelo Método direto e Centrifugação por formol-éter.

No Brasil, os relatos de prevalência variam em função da idade da população estudada bem como de diferenças geográficas e sócio-econômicas (GENTA, 1989). Os maiores índices de prevalência foram encontrados nos Estados de Minas Gerais, Amapá, Goiás e Rondônia (FERREIRA, 1991).

Uberlândia, MG; é uma região hiperendêmica, pois utilizando os métodos de Baermann-Moraes (BAERMANN 1917, MORAES 1948) e o de LUTZ (1919), registrou-se 13% de ocorrência da infecção por *S. stercoralis* em crianças de 4 meses a 7 anos de idade da área urbana do município. (MACHADO, COSTA-CRUZ, 1998).

Desde janeiro de 1990 por um período de 77 meses, FERREIRA *et al.*, (1999) descreveram 25 casos de strongiloidíase em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) na Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) onde diferentes espécimes (escarro, fezes) foram analisados por variados métodos como: exames parasitológicos (método de Blagg ou MIFC "Mertiolate, Iodo, Formol, Conservante" e método de Baermann-Moraes), visualização direta ocasional na pesquisa de piócitos e hemácias (PPH), MIFC associado ao PPH e escarro, e pelo método de coloração de fezes (Kinoyun), demonstrando a ausência de metodologia laboratorial adequada para suporte aos exames clínicos.

O diagnóstico da strongiloidíase é definido quando por métodos específicos, larvas do parasita são encontradas nas fezes (BAERMANN, 1917; ARAKAKI *et al.*, 1990; KOGA *et al.*, 1991; KAMINSKY, 1993; SUKHAVAT *et al.*, 1994; SALAZAR, *et al.*, 1995; SATO *et al.*, 1995b; SANTOS, PADILHA FILHO, 1996), no fluido duodenal (JONES, ABADIE, 1954;

BEAL *et al.*, 1970; ASSEFA *et al.*, 1991; CHEN *et al.*, 1994), ou ocasionalmente em outros tecidos ou fluídos de pessoas infectadas (AVRAM *et al.*, 1984; HUARATO SEDDA *et al.*, 1990; MURTY *et al.*, 1994; TAKAYANAGUI *et al.*, 1995).

Exame fecal e cultura em papel de filtro têm sido os métodos convencionais para detectar larvas em amostras fecais. Entretanto, esses métodos não são considerados sensíveis o bastante para o diagnóstico dos casos crônicos, onde as larvas estão presentes em pequeno número ou frequentemente ausentes (SATO, KOBAYASHI, SHIROMA, 1995).

A dificuldade para detecção de larvas de *S. stercoralis* nas fezes pelo exame parasitológico constitui um dos problemas mais comuns no diagnóstico da estrogiloidíase humana. Mesmo utilizando o mais novo e sensível método (cultura em placa de ágar) é necessário examinar três amostras fecais colhidas em dias alternados num período de 10 dias para a obtenção de resultado mais eficiente (KOGA *et al.*, 1991; KOGA *et al.*, 1992; SATO *et al.*, 1995).

O emprego de testes imunológicos poderá contribuir significativamente para esclarecimento em diagnósticos clínicos e estudos soroepidemiológicos (ROSSI *et al.*, 1993a).

O teste cutâneo realizado com extratos de larvas filarióides, por Fuellerboni em 1926 surgiu da observação clínica de reações (cutâneas *Larvas currens* e urticária não específica) da doença; sugerindo a existência de resposta alérgica (hipersensibilidade) à larva filarióide que migra pela pele (PIRES, DREYER, 1993).

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) com diversidade na sua padronização, tanto em relação aos antígenos de larvas filarióides utilizados como na execução da técnica em lâminas, em tubos ou na detecção de diferentes classes de imunoglobulinas tem sido realizada por diversos pesquisadores (COUDERT *et al.*, 1968; DAFALLA, 1972; GROVE, BLAIR, 1981; GENTA, WELL, 1982; CAMPOS *et al.*, 1988; COSTA-CRUZ *et al.*, 1997).

O teste Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) é econômico no que se refere ao uso de reagentes e sensível na detecção de anticorpos, além do grande número de amostras que podem ser testadas num curto período de tempo (MALE, STEWARD, 1997). Na literatura, esta reação tem sido descrita utilizando-se diferentes extratos antigênicos para detecção de diferentes classes de imunoglobulinas nos soros humanos de indivíduos infectados pelo *S. stercoralis* (GAM *et al.*, 1978; CARROL *et al.*, 1981; GENTA, 1987; MANGALI *et al.*, 1991; LINDO *et al.*, 1994; SATO, KOBAYASHI, SHIROMA, 1995; COSTA-CRUZ *et al.*, 1998; COSTA-CRUZ *et al.*, 1999).

Uma das principais limitações encontradas no desenvolvimento de testes sorológicos mais sensíveis e específicos é a dificuldade em se obter quantidade suficiente de antígenos que permita seu posterior fracionamento e análise (ROSSI *et al.*, 1993b). Diante disto, é conveniente a padronização e utilização de antígenos provenientes de *Strongyloides ratti* (Sandground, 1925). *S. ratti* é um helminto de ratos silvestres que infecta facilmente o rato branco e pode ser mantido em laboratório sem dificuldades. As larvas filarióides podem ser obtidas em grande número a partir de culturas de fezes dos ratos infectados, o que simplifica a obtenção de antígenos (PELLEGRINO *et al.*, 1961).

A composição antigênica de *Strongyloides* de roedores (*S. ratti* e *S. venezuelensis*) foi comparada com a de *S. stercoralis* e observou-se que estas espécies podem ser utilizadas como fonte de antígenos para o diagnóstico em soro em substituição ao antígeno de *S. stercoralis* provendo uma fonte segura de antígeno para o diagnóstico em laboratório (GROVE, BLAIR, 1981; SATO, KOBAYASHI, SHIROMA, 1995; COSTA-CRUZ *et al.*, 1997).

O Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia desenvolve desde 1994 a linha de pesquisa denominada "Diagnóstico da Estrongiloidíase Humana", tendo realizado a padronização da detecção de IgG, IgM e IgA pelas reações de Imunofluorescência indireta com antígeno homólogo e heterólogo e ELISA com antígeno heterólogo (COSTA-CRUZ *et al.*, 1997).

Desde 1960 o tiabendazol e albendazol têm sido as drogas escolhidas para o tratamento da infecção por *S. stercoralis*, mas apresentam vários efeitos colaterais e não apresentam eficácia em programas de controles de endemias. Estudos recentes demonstraram que a Ivermectina uma droga de uso em medicina veterinária tem sido mais efetiva e segura no controle de doenças endêmicas como a estrongiloidíase humana (LINDO *et al.*, 1996; FERREIRA *et al.*, 1999).

Resposta imune humoral na estrongiloidíase humana e o papel da imunoglobulina E (IgE)

As imunoglobulinas ou anticorpos, são glicoproteínas presentes no soro e líquidos tissulares de todos os mamíferos. Na maioria dos mamíferos superiores, existem 5 classes diferentes de Imunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Elas diferem entre si no tamanho, carga elétrica, composição de aminoácidos e conteúdo de carboidratos. (ROITT, BROSTOFF, MALE, 1997).

Dentre as 5 classes de imunoglobulinas, a IgE embora em pequena quantidade no soro (0,05 µg/ml), é encontrada nas membranas da superfície de mastócitos e basófilos. Através de sua porção Fc, a IgE sensibiliza as células alvos nas superfícies das mucosas conjuntival, nasal e brônquicas.

Os níveis de IgE estão freqüentemente elevados na doença alérgica e em infecções parasitárias. Quando crianças e adultos são avaliados quanto a presença de doenças atópicas, níveis elevados de IgE auxiliam na definição do diagnóstico, embora níveis normais de IgE não excluam atopia.

A IgE pode, ainda, ter papel importante na imunidade contra os helmintos, mas em países desenvolvidos está mais comumente associada a doenças de hipersensibilidade imediata tais como asma e febre do feno (ROITT, BROSTOFF, MALE, 1997).

A IgE está presente no soro do cordão umbilical (de zero a pouco ng/ml) em quantidades não correlacionáveis aos níveis séricos maternos, indicando que IgE não atravessa a placenta (CALICH, VAZ, 1988)

A estrongiloidíase pode ser incluída no grupo das infecções helmínticas que estimulam a presença de IgE (BEZJAK, 1975).

A concentração de IgG, IgA, IgM e IgE em amostras de soro e IgG, IgA e IgM no fluido duodenal e nas fezes foram determinadas por imunodifusão radial em 28 pacientes com estrongiloidíase; metade dos pacientes apresentaram elevados níveis de anticorpos IgE nas amostras de soro que variavam entre 810 a 14600 unidades/ml. A concentração média de IgG, IgA e IgM nos soros não apresentaram alterações significativas, embora os valores médios de IgG e IgM tivessem se mantido ligeiramente elevados e os de IgA ligeiramente diminuídos. As concentrações de IgG, IgA e IgM no fluido duodenal estavam nos limites normais; apenas IgA foi constantemente detectada; IgG e IgM foram detectados em 18 e 26 pacientes, respectivamente. Nas fezes, a imunoglobulina mais freqüentemente detectada foi a IgA enquanto que a IgG e IgM foram encontradas em apenas quatro pacientes (BEZJAK, 1975).

Elevados níveis de IgE específica foram detectados em indivíduos com estrongiloidíase por LEAO *et al* (1980). A importância do Radioallergosorbant (RAST) na detecção de IgE específica em pacientes com estrongiloidíase foi demonstrada por (McRURY *et al.*, 1986).

Em áreas endêmicas, a elevação de IgE total não é índice para diagnosticar estrongiloidíase (MESSIAS *et al.*, 1987).

Níveis de IgE sérica total e anticorpos específicos IgG e IgA anti-*S. stercoralis* foram pesquisados em amostras de soros de 27 pacientes com estrongiloidíase comprovada por método parasitológico no Estado de São Paulo através de técnicas imunoenzimáticas. Manifestações clínicas nesta série de casos foram investigadas pelo estudo retrospectivo dos prontuários dos pacientes. Em 59% dos pacientes, os níveis de IgE sérica detectados pelo teste ELISA foram elevados (maior do que 250 UI/ml - concentração média = 1364 UI/ml). Anticorpos específicos IgG e IgA anti-*S. stercoralis* foram detectados respectivamente em 23 (85,2%) e 21 (77,8%) pacientes (ROSSI *et al.*, 1993b).

Em uma população endêmica na Jamaica, indivíduos infectados com *S. stercoralis*, apresentaram níveis séricos de IgG₁ inversamente correlacionados com a idade. Foi observado menores níveis de IgE em grupos de idade avançada, enquanto que níveis de IgA foram similares em ambos os grupos endêmicos (30 a 80 anos e 6 a 29 anos) Níveis de IgG₄ foram similares em todos os grupos estudados. O estudo sugeriu que a idade está correlacionada com a infecção crônica por *S. stercoralis* em comunidades endêmicas, em indivíduos que adquirem a infecção precocemente podem permanecer infectados até a vida adulta. A elevada produção de IgG₄ em combinação com a baixa resposta de IgE pode estabelecer a infecção e promover a estrongiloidíase crônica assintomática. A auto regulação nos níveis de IgA pode estar envolvida no controle de infecção crônica, em área não endêmica pois interfere na redução da produção de IgG₁ (ATKINS *et al.* 1997).

Neste trabalho desenvolveu-se como alternativa no diagnóstico laboratorial da estrongiloidíase humana, o método imunológico ELISA para a detecção de anticorpo IgE específica anti-*S. stercoralis* e total, utilizando-se antígenos de *S. ratti* em amostras de soros.

2. OBJETIVO

Determinar níveis de IgE específica e total por ELISA em amostras de soros, utilizando como antígeno heterólogo larvas filarióides de *S. ratti* no diagnóstico da estrogiloidiase humana.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção de *Strongyloides ratti*

Para a obtenção de *S. ratti*, foram utilizadas fezes de ratos da espécie *Rattus rattus* mantidos infectados por inoculação em laboratório. O inóculo foi feito por via subcutânea no volume de 1ml da suspensão de 2000 larvas por rato. Após inoculação, os ratos permaneceram 10 dias até as próximas culturas.

Os animais, após 10 dias de inoculação, foram colocados em gaiolas metálicas, forradas com papel umedecido em água, permanecendo por uma noite em defecação.

Após este período, fez-se a colheita das fezes para proceder o cultivo pelo método Looss. No 5º dia, obteve-se as larvas pelo método de Baermann-Moraes, sendo o material concentrado através de centrifugação (1500 rpm por 15 minutos) e mantidos a -20°C. As larvas assim obtidas foram gentilmente cedidas pela Profª Drª Dulcinéa M. B Campos do Laboratório de Parasitologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

Realizou-se a contagem das larvas em 10µl deste concentrado em três lâminas distintas e através da média entre as três lâminas, verificou-se a quantidade de larvas existentes em 1 ml.

3.1.1. Método de Looss

Para coprocultura foram misturadas partes iguais de material fecal e carvão vegetal triturados em grãos pequenos. Esta mistura foi umedecida ligeiramente e estendida em placas de Petri, de modo a formar uma camada não espessa, que permaneceu em repouso à temperatura de 25°C em estufa incubadora BOD (FANEM, São Paulo) por 5 dias. (NEVES *et al.*, 1995) Após este procedimento foram recolhidas as larvas pelo método de Baermann-Moraes

3.1.2. Método de Baermann-Moraes

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

Cada funil foi preenchido até à borda com água de torneira à temperatura de 45°C, sobre o mesmo foi colocado uma tela metálica (100 malhas por cm²) e sobre esta colocou-se gaze dobrada em quatro, depositando-se sobre a mesma aproximadamente 10 g de fezes. A gaze com a amostra fecal foi deixada em contato com a água, em repouso por uma hora e foi retirado o tubo de ensaio com cerca de 5 a 7 ml de solução contendo água. Após concentração por centrifugação (1500 rpm) por 15 minutos as larvas foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato pH 7,2 (PBS) por centrifugação a 1500 rpm durante três minutos por cinco vezes e conservadas a -20°C até o momento do uso (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948).

3.2 Produção do extrato salino de *S. ratti*

As larvas de *S. ratti* obtidas no item 3.1 foram descongeladas e ressuspensas em 3 ml de PBS. As mesmas foram rompidas, para extração protéica com auxílio de homogeneizador de tecidos (GLAS-COL) por 5 períodos de um minuto em banho de gelo e posteriormente, através de passagem por ultra som (Thorton, Inpec Eletrônica São Paulo) a 40 Khz em quatro períodos de 20 segundos em banhos de gelo. O material foi deixado sob agitação lenta por 18 horas à 4°C para extração antigênica, e centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos à 4°C em centrífuga refrigerada (SORVALL, RC 5C plus, USA). O conteúdo protéico do sobrenadante foi dosado através do método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

3.3 Amostras de soros

Foram colhidos 10 ml de sangue de indivíduos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), por punção venosa e encaminhados ao Laboratório de Parasitologia para obtenção das amostras de soro por centrifugação. As amostras de soros foram armazenadas à -20°C até o momento do uso.

Para colheita do material fecal e do sangue de pacientes com outras parasitoses e pacientes com *estrongiloidíase* foi assinado um termo de consentimento (anexo 1), no qual os

pacientes ou responsáveis declararam estar cientes dos objetivos do trabalho, bem como da importância de sua colaboração para o mesmo.

Para completar a identificação das amostras de soros, foram anotados dos indivíduos sadios e de prontuários dos pacientes, a sigla dos nomes, a idade, sexo e procedência.

3.3.1 Amostras de soros de pacientes com estrogiloidíase (grupo I)

Foram obtidas 40 amostras de soros de indivíduos com diagnóstico comprovado da parasitose através da identificação de larvas de *S. stercoralis* no material fecal pelo método de MIFC (Mertiolate, Iodo, Formol, Conservante) realizado como rotina parasitológica no Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU.

3.3.2 Amostras de soros de pacientes com outras parasitoses (grupo II)

Com o objetivo de verificar reatividade cruzada com outras parasitoses, nos métodos imunológicos, foram estudadas 40 amostras de soros de indivíduos, com diferentes parasitoses Ancilostomídeos (11); *Enterobius vermicularis* (4); *Hymenolepis nana* (7); *Trichuris trichiura* (6); *Ascaris lumbricoides* (5) *Giardia lamblia* (7) todos foram triados no Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU pelo método de Blagg ou MIFC ou pelo método de Hoffmann, Pons e Janer no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Uberlândia (NEVES *et al.*, 1995).

3.3.2.1 Método de Hoffmann, Pons e Janer

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

Em "becker" de 250 ml de capacidade, contendo cerca de 10 ml de água de torneira, foram depositadas 2 a 6 g de fezes, que foram fragmentadas por meio de bastão de vidro; acrescentou-se mais água, até completar um volume aproximado de 15 ml sob agitação constante. A suspensão foi filtrada, através de gaze cirúrgica dobrada quatro vezes, sobre tela metálica com 100 malhas por cm² e transferida para cálice cônico de sedimentação com 200 ml de capacidade. Os detritos retidos na gaze foram lavados com água corrente, agitando-os constantemente com um bastão de vidro, sobre o mesmo cálice. A suspensão assim preparada foi deixada em repouso durante 24 horas. Enquanto o sobrenadante permanecia turvo, este era descartado cuidadosamente sem levantar ou perder o sedimento. Em seguida o sedimento era novamente ressuspensão, completando-se o volume com água até um total de 200 ml e deixado

em repouso por duas horas, período após o qual, descartava-se o sobrenadante, deixando no recipiente o sedimento para leitura. Foram preparadas três lâminas para cada amostra fecal. Do sedimento foram colhidas duas gotas com auxílio de pipeta, às quais foram colocadas sobre lâminas (7,5 cm de comprimento por 2,5 cm de largura) e adicionadas uma gota de lugol, homogeneizada, cobertas com lamínulas de vidro (24mm x 24mm) e examinadas em microscópio óptico binocular (OLYMPUS - CH2, Japão) com objetiva em aumento de 10 e 40 vezes.

Em caso de amostras negativas, foram preparadas mais duas lâminas para confirmação do resultado.

3.3.3 Amostras de soros controles de indivíduos sadios (grupo III)

Foram obtidos por doação à disciplina de Parasitologia, 40 amostras de soros controles de indivíduos sadios, sendo 35 estudantes universitários e cinco crianças, que em três exames parasitológicos de fezes realizados pelos métodos de Baermann-Moraes e HPJ não foram detectadas larvas de *S. stercoralis* ou outra parasitose. Os mesmos ou seus responsáveis negaram história anterior de estrogiloidíase.

3.3.4. Amostras de soros controles positivos e negativos

O soro controle positivo foi constituído de uma amostra de soro de um paciente com estrogiloidíase que apresentou larvas rabditóides do parasito nas fezes pelo método de Baermann-Moraes.

As quatro amostras de soros padrão negativos foram obtidas de 4 indivíduos sadios assintomáticos, que em três exames parasitológicos de fezes pelo método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917, MORAES, 1948) e o método de Hoffmann, Pons e Janer (HOFFMANN, PONS, JANER, 1934) foram negativos para *S. stercoralis* ou outros parasitos e que não apresentaram história anterior de estrogiloidíase.

3.4. Testes imunoenzimáticos ELISA

3.4.1. Testes ELISA para detecção dos níveis de IgE anti-*S. stercoralis*

Microplacas de poliestileno de alta avidéz (Corning Laboratories Inc., USA) foram sensibilizadas com extrato salino de *S. ratti* (0,5µg / 50 µg) em tampão carbonato- bicarbonato 0,06M, pH 9,6 por 18 horas a 4°C.

Em seguida, as placas foram lavadas por 3 vezes com solução salina tamponada com fosfato 0,01 M pH 7,2 (PBS) adicionada de Tween 20 a 0,05% (PBS-T) (Polyoxyethylene-sorbitam monolaurate-SIGMA), subseqüentemente bloqueadas (200µl/poço) com solução de PBS-T adicionado de soroalbumina bovina (BSA-SIGMA) a 1%, por 1 hora à temperatura ambiente. Novamente as placas foram submetidas a três ciclos de lavagens com PBS-T e em seguida foram adicionados 50µl/poço das amostras de soros controles positivos e negativos e amostras do (grupos I,II e III) em cada placa em duplicata, na diluição de 1:2 em PBS-T + BSA 1%. Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas por 5 vezes com PBS-T, seguindo-se a adição (50µl/poço) do anticorpo secundário IgG de cabra anti-IgE humana biotinizada (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., MD, USA) diluído a 1:1000 em PBS-T + BSA 1%. As microplacas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente.

Procedeu-se a novas lavagens como anteriormente descrito, e adicionou-se (50µl/poço) o conjugado estreptavidina-peroxidase a 1:1000 (Sigma Chemical Co.USA) em PBS-T + BSA 1%, incubando-se por 30 minutos à temperatura ambiente.

Após a última lavagem das placas com PBS-T por 5 vezes, adicionou-se o substrato enzimático que consistiu de solução de 2,2'-azino bis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid (ABTS -SIGMA) a 0,01M em tampão citrato-fosfato 0,07M pH 4,2, contendo 0,03% de H₂O₂. A leitura foi realizada em leitor de microplacas ELISA (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories,USA) a 405nm em tempos variáveis.

Os resultados dos valores das densidades ópticas (D.O) obtidos foram arbitrariamente expressos em Índice ELISA (IE) considerando o valor do *cut off*=100.

Segundo a fórmula: $IE = \frac{D.O \text{ amostra}}{cut \text{ off}} \times 100$.

cut off

Onde *cut-off* foi determinado pela média das densidades ópticas obtidos dos soros controles negativos acrescidos de 5 desvios padrão.

3.4.2 Teste ELISA para detecção dos níveis de IgE séricos total

Testes imunoenzimáticos ELISA foram realizados para determinação dos níveis de IgE total no soro de pacientes do grupo I, II e III, segundo técnica descrita por POLLART et al. (1989), com algumas modificações.

Microplacas de poliestireno (Immulon 2®, Dynatech Laboratories Inc., USA) foram sensibilizadas (50µl/poço) com anticorpo monoclonal anti-IgE humana (SIGMA) na diluição de (1:5000) em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M, pH 9,6 e incubadas por 18 horas a 4°C.

Em seguida, as placas foram lavadas por 3 vezes com solução PBS-T e subsequentemente bloqueadas (200µl/poço) com solução de PBS-T + BSA 1% por 1 hora à temperatura ambiente. Novamente, as placas foram submetidas a três ciclos de lavagens com PBS-T e seguiu-se a adição (50µl/poço) das amostras, em três diluições (1:5, 1:25 e 1:125) em PBS-T + BSA 1%.

Após a incubação por 1 hora à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas por 5 vezes com PBS-T, seguindo-se a adição (50µl/poço) do anticorpo secundário de IgG de cabra anti-IgE humana biotinizada (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc) diluído a 1:4000 em PBS-T + BSA 1%, incubando-se por 1 hora à temperatura ambiente. As etapas subsequentes (conjugado estreptavidina-peroxidase e substrato enzimático) foram realizadas como descrito para ELISA IgE específica.

Os valores de absorbância obtidos das amostras de soros foram convertidos em U/ml segundo a curva padrão, construída através de diluições duplas seriadas com PBS-T+BSA 1% em duplicata, de soro (indivíduo ARN) que foi como 300U/ml de IgE total. Considerando o valor de 100 U/ml como limite de normalidade.

.5 Análise estatística

Utilizou-se o t de Student para comparar as médias geométricas entre os três grupos e o teste Qui-Quadrado para comparar a positividade entre os três grupos no nível de significância de $p < 0,05\%$. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando software: GRAPHAD PRISM versão 3.0.

3.6 Normas de biossegurança

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

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção de *Strongyloides ratti*

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

4.2. Produção de extrato salino de *S.ratti*

Foram utilizadas 90.000 larvas para obtenção do extrato salino de *S. ratti*. A concentração protéica foi de 140 µg/ ml e o volume obtido, de 2 ml.

4.3. Identificação das amostras de soros testados

As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam, respectivamente, dados de identificação dos 40 pacientes com estrongiloidíase, 40 pacientes com outras parasitoses e 40 indivíduos sadios, quanto ao sexo, idade e resultados de IgE específica e IgE total.

4.4. Níveis séricos de IgE específica anti- *S. stercoralis*

A Figura 1 demonstra os níveis séricos de IgE específica a *S. stercoralis* determinados por ELISA em 40 pacientes que eliminavam larvas de *S. stercoralis* nas fezes (grupo I), 40 pacientes com outras parasitoses (grupo II) e 40 indivíduos sadios (grupo III). Os resultados foram expressos em Índice ELISA (IE), considerando o valor do *cut off*=100

A média geométrica (m.g.) dos níveis de IgE específica a *S.stercoralis* foi significativamente maior no grupo I (143, $p<0,05$) que nos grupos II (70) e III (76), não havendo diferença significativa nas médias geométricas entre os grupos II e III ($p>0,05$).

A positividade para IgE *anti-S. stercoralis* foi de 55% (22/40) no grupo I, 2,5% (1/40) no grupo II e 17,5% (7/40) no grupo III. A positividade encontrada foi significativamente maior ($p < 0,05$) para o grupo I em relação aos grupos II e III, mas não entre os grupos II e III (Figura 2).

4.5. Níveis de IgE sérica total

Foram quantificados os níveis de IgE total no soro dos pacientes dos três grupos analisados considerando o valor de 100 U/ml como limite de normalidade. O Grupo I apresentou níveis significativamente maiores (m. g. 866 U/ml, $p < 0,05$) em relação aos grupos II (302 U/ml) e III (313 U/ml). Entretanto, não houve diferença significativa nas médias geométricas de IgE total encontradas no grupo II e III, como demonstrado na Figura 3.

A percentagem de positividade para IgE total não revelou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os três grupos: 77,5% (31/40) no grupo I, 67,5% (27/40) no grupo II e 70 % (28/40) no grupo III (Figura 4).

4.6. Correlação entre os níveis de IgE total e IgE específica a *S. stercoralis*

Uma correlação entre os níveis de IgE total e IgE específica a *S. stercoralis* foi realizada para as amostras de soros do grupo I, apresentando significante correlação positiva ($r = 0,62$, $p < 0,001$) como ilustrado na Figura 5.

A grande maioria dos pacientes com positividade para IgE específica a *S. stercoralis* também apresentaram níveis de IgE total acima do limiar de normalidade (100 U/ml).

Tabela 1- Identificação dos 40 casos de pacientes com diagnóstico de *S. stercoralis* nas fezes segundo sexo, idade e resultado dos testes imunológicos para detecção de níveis de IgE (grupo I).

CASO	SIGLA	SEXO	IDADE (ANOS)	IgE Específica *(IE)	IgE Total **(U/ml)
1	JJ	M	38	73,7	10,5
2	MJS	F	31	100,0	2029,0
3	MCFC	F	25	84,0	10,3
4	DXP	M	40	94,8	638,8
5	AVP	M	63	80,4	850,5
6	MAF	F	37	90,7	53,1
7	GLC	M	48	201,8	1728,1
8	CR	M	20	175,3	3122,2
9	CRA	F	39	174,2	2106,5
10	LSM	F	17	85,1	52,5
11	LPRO	F	61	86,1	8,3
12	VPB	F	46	321,6	3058,8
13	DAT	F	09	75,3	35,5
14	JAS	M	73	522,7	68,3
15	LCRV	F	5	83,0	331,6
16	LEM	F	47	90,7	813,3
17	CAR	M	38	114,4	9007,7
18	WL	M	52	288,1	6790,4
19	JFC	M	53	271,1	4024,0
20	JLS	M	53	96,4	37500,0
21	KCS	F	19	68,0	3193,5
22	JS	M	36	89,2	40,4
23	JSS	M	32	169,1	2732,9
24	MAS	F	31	198,6	4546,8
25	MALM	F	25	137,5	4516,4
26	MEE	F	27	203,1	1355,4
27	SP	F	19	584,5	7700,8
28	JMR	M	26	242,1	1151,3
29	RP	M	60	184,5	604,4
30	JSB	M	23	602,1	13546,7
31	MCFC	F	25	101,5	1367,4
32	VPB	M	42	207,7	5114,0
33	NPS	M	14	75,8	46,6
34	ESS	M	37	95,9	544,5
35	JFC	M	49	79,9	1629,1
36	LLN	M	41	203,2	4286,0
37	EE	M	53	539,7	5085,8
38	Matheus	M	25	73,7	439,3
39	SMA	M	40	123,1	2253,8
40	IPB	F	39	99,0	1217,6

* IE = Índice ELISA (limite de positividade=100)

** U / ml = Unidade / ml (limiar de normalidade= 100)

Tabela 2- Identificação dos 40 pacientes com outras parasitoses segundo sexo, idade e resultados dos testes imunológicos de níveis de IgE (grupo II)

	SIGLA	SEX O	IDADE(ANOS)	PARASITAS	IgE Específica *(IE)	IgE Total **(U/ml)
1	FRS	F	20	Ancilostomídeos	75,3	173,8
2	RSP	F	14	Ancilostomídeos	73,8	130,2
3	MF	F	17	<i>H. nana</i>	93,1	157,0
4	AFRB	F	25	<i>T. trichiura</i>	89,7	2729,5
5	CM	F	23	<i>T. trichiura</i>	75,7	9,1
6	ABOS	M	4	<i>A. lumbricoides</i>	65,3	849,3
7	RMM	F	25	<i>T. trichiura</i>	69,3	618,0
8	LRO	F	31	Ancilostomídeos	60,9	394,3
9	SIC	F	25	Ancilostomídeos	76,6	10442,5
10	ASA	F	11	<i>G. lamblia</i>	75,9	1927,4
11	MCNS	F	22	<i>H. nana</i>	76,4	206,3
12	JDSB	F	18	<i>A. lumbricoides</i>	104,8	240,0
13	RPS	F	56	Ancilostomídeos	73,8	11305,5
14	RNC	F	24	<i>H. nana</i>	68,0	456,2
15	AHM	M	2	<i>G. lamblia</i>	66,1	1103,5
16	MRA	F	20	<i>T. trichiura</i>	68,6	1503,2
17	SMLS	F	21	<i>H. nana</i>	75,5	67,1
18	RSD	M	9	<i>E. vermicularis</i>	71,3	385,4
19	ESTL	F	23	Ancilostomídeos	74,5	73,1
20	GPS	F	1	<i>G. lamblia</i>	65,3	48,9
21	PAN	M	40	<i>H. nana</i>	63,6	626,5
22	MMFS	M	24	Ancilostomídeos	67,8	38,9
23	MAS	F	37	Ancilostomídeos	62,3	229,6
24	AES	M	45	<i>H. nana</i>	64,6	158,1
25	CCS	M	26	Ancilostomídeos	71,8	97,5
26	LCM	F	2	<i>E. vermicularis</i>	74,1	48,7
27	RFP	M	4	<i>A. lumbricoides</i>	69,7	8,7
28	ASN	M	5	<i>A. lumbricoides</i>	69,9	7692,4
29	ESMF	F	32	<i>A. lumbricoides</i>	70,5	498,9
30	LBF	M	3	<i>G. lamblia</i>	57,9	4054,3
31	MFM	F	3	<i>G. lamblia</i>	56,5	14,9
32	MDGS	M	10	<i>E. vermicularis</i>	73,4	67,0
33	DGA	F	5	<i>G. lamblia</i>	73,4	1807,0
34	ABS	M	4	<i>T. trichiura</i>	74,5	19,3
35	VLO	F	31	Ancilostomídeos	66,1	749,9
36	NKA	F	5	<i>E. vermicularis</i>	59,6	156,0
37	MCNS	F	22	<i>H. nana</i>	60,0	8500,0
38	LPB	M	6	<i>G. lamblia</i>	61,1	59,3
39	VRM	F	37	Ancilostomídeos	55,4	80,1
40	JRL	M	2	<i>T. trichiura</i>	78,4	116,0

* IE = Índice ELISA (limite de positividade = 100))

** U /ml = Unidade / ml (limiar de normalidade =100)

Tabela 3- Identificação dos 40 indivíduos sadios segundo sexo, idade e os resultados dos testes imunológicos para detecção de níveis de IgE (grupo III).

CASO	SIGLA	SEXO	IDADE	IgE Específica *(IE)	IgE Total **(U/ml)
1	EL	M	24	63,5	8414,6
2	WMF	M	6	57,8	11,6
3	LCFF	M	6	61,9	4747,9
4	DSR	M	11	67,5	151,5
5	JC	M	48	60,5	280,3
6	LNS	M	54	71,8	660,5
7	E HR	M	32	71,5	129,9
8	JEJ	F	41	77,4	7,4
9	JFS	F	22	77,4	450,1
10	WBS	M	18	70,9	7,6
11	NF	F	21	104,2	48,4
12	BVS	F	21	57,9	657,7
13	FGF	M	21	84,7	337,7
14	JJ	F	24	62,1	1199,1
15	DS	F	23	72,9	0,0
16	AM	M	21	68,8	108,8
17	MJ	F	25	70,9	1059,2
18	AFA	F	23	104,2	19,6
19	RAG	M	28	70,0	143,0
20	FGM	M	31	67,1	25,5
21	FCF	M	25	65,0	589,2
22	LMO	F	28	137,0	93,8
23	FFAA	F	21	61,4	1440,5
24	PSVC	M	23	69,9	68,9
25	TAL	F	21	69,3	488,3
26	ESS	M	40	85,9	665,5
27	EHC	M	50	65,2	88,3
28	SOP	M	40	91,7	447,1
29	RSC	F	21	72,0	37500,0
30	LCS	M	57	72,0	409,3
31	ANS	M	41	71,1	406,4
32	CL	F	23	121,7	1479,2
33	GMS	M	30	120,6	2255,0
34	RS	M	32	74,5	1190,4
35	JFF	M	51	65,4	45,8
36	GDG	M	5	79,2	3614,7
37	KOS	F	2	76,8	37,8
38	SIC	F	25	70,8	4230,9
39	CC	F	25	106,1	67,4
40	ACM	F	21	109,8	447,5

*IE = Índice ELISA (limite de positividade=100)

** U / ml = Unidade / ml (limiar de normalidade = 100)

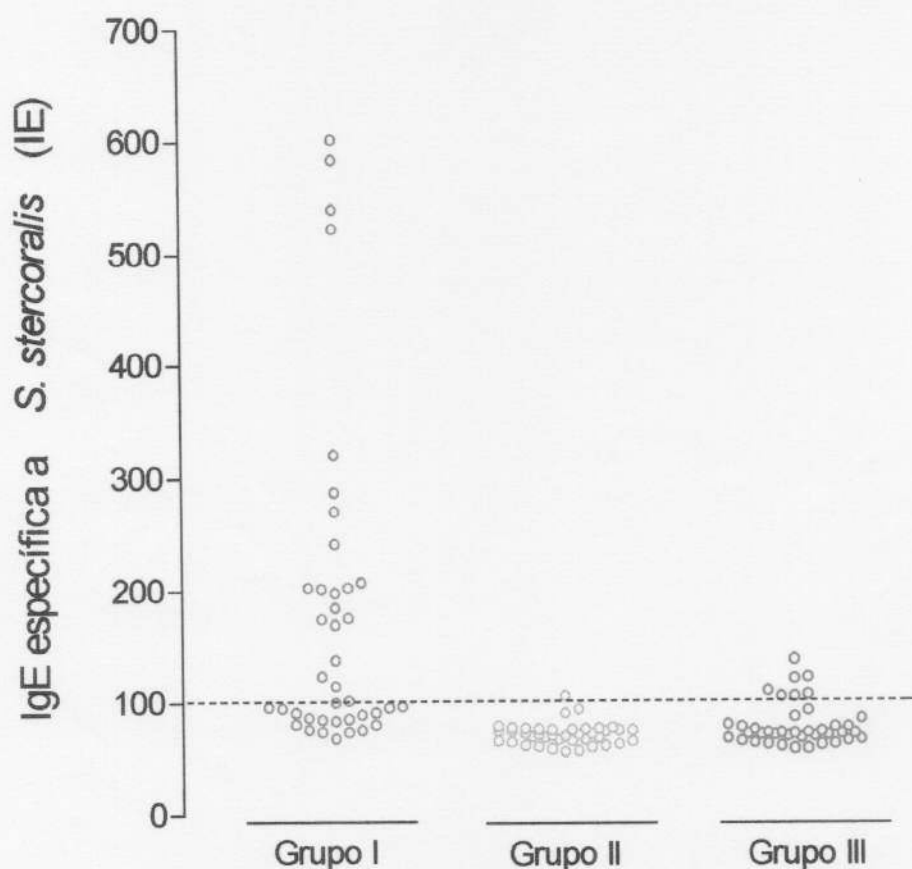


Fig.1. Níveis de IgE sérica específica a *S. stercoralis* obtidos por ELISA (Índice ELISA = IE) em três grupos de pacientes: grupo I (pacientes com estrongiloidíase, $n = 40$), grupo II (pacientes com outras parasitoses, $n = 40$) e grupo III (indivíduos sadios, $n = 40$). A linha tracejada indica o limiar de positividade ($cut\ off = 100$). m.g. = média geométrica, $*p < 0,0001$.

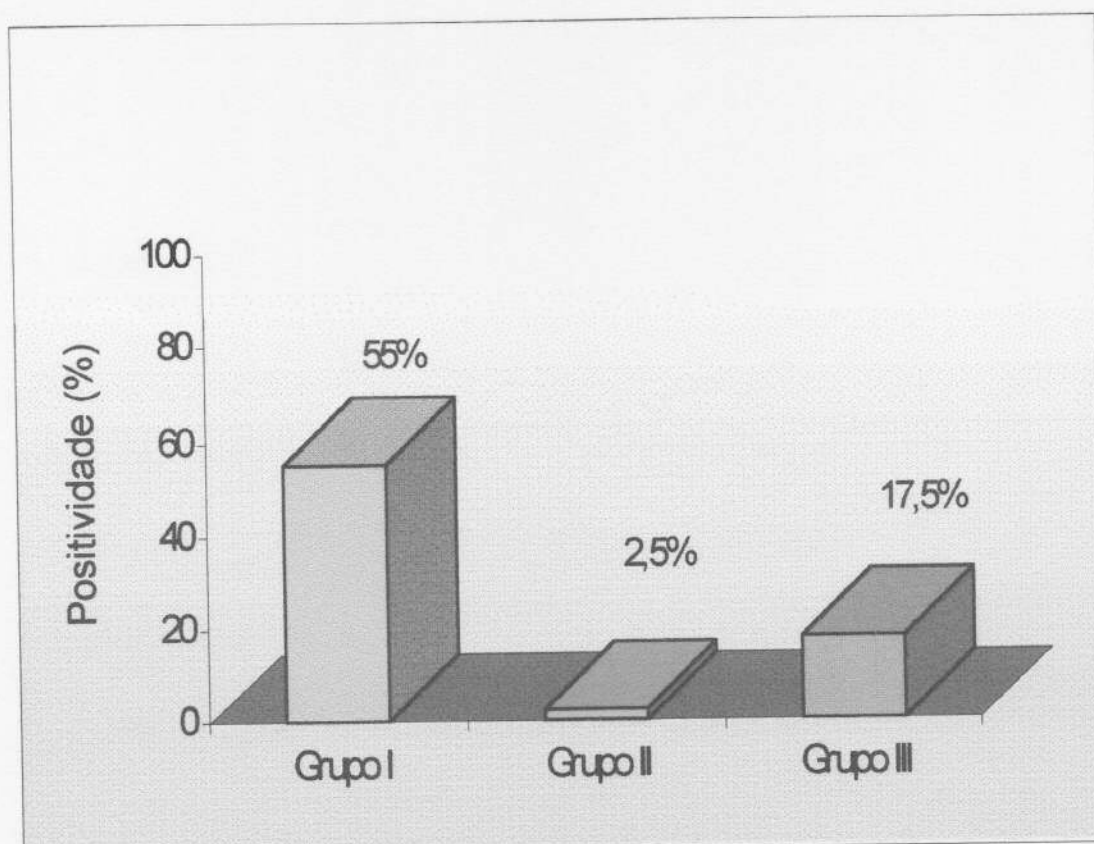


Fig. 2. Percentagem de positividade para IgE sérica específica a *Strongyloides stercoralis* determinada por ELISA em três grupos: grupo I (pacientes com estrongiloidíase, n = 40), grupo II (pacientes com outras parasitoses, n = 40) e grupo III (indivíduos sadios, n = 40), *p < 0,0005.

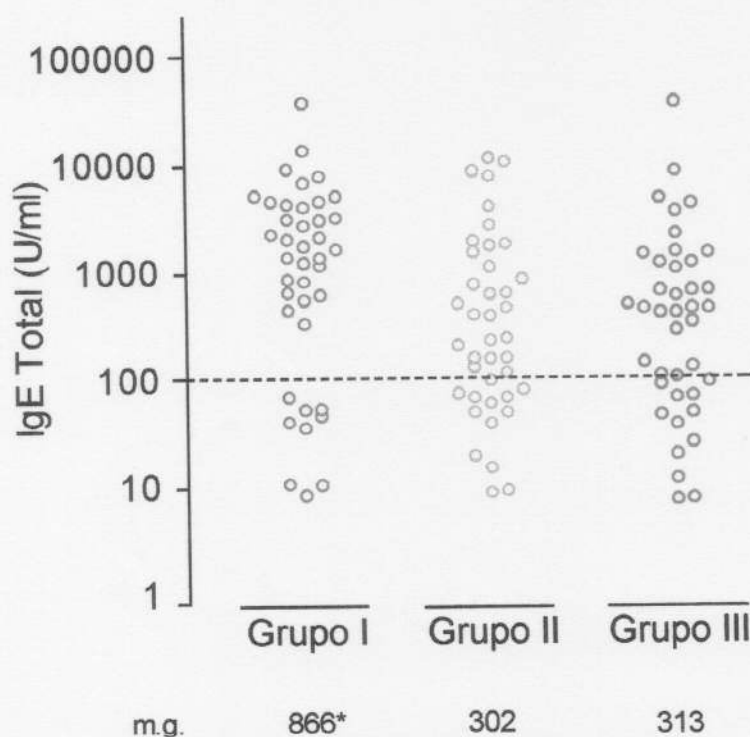


Fig. 3. Níveis de IgE sérica total (U/ml) obtidos por ELISA em três grupos de pacientes: grupo I (pacientes com estrogiloidíase, $n = 40$), grupo II (pacientes com outras parasitoses, $n = 40$) e grupo III (indivíduos sadios, $n = 40$). A linha tracejada indica o limite de normalidade (100U/ml). m.g.= Média geométrica, $*p < 0,05$.

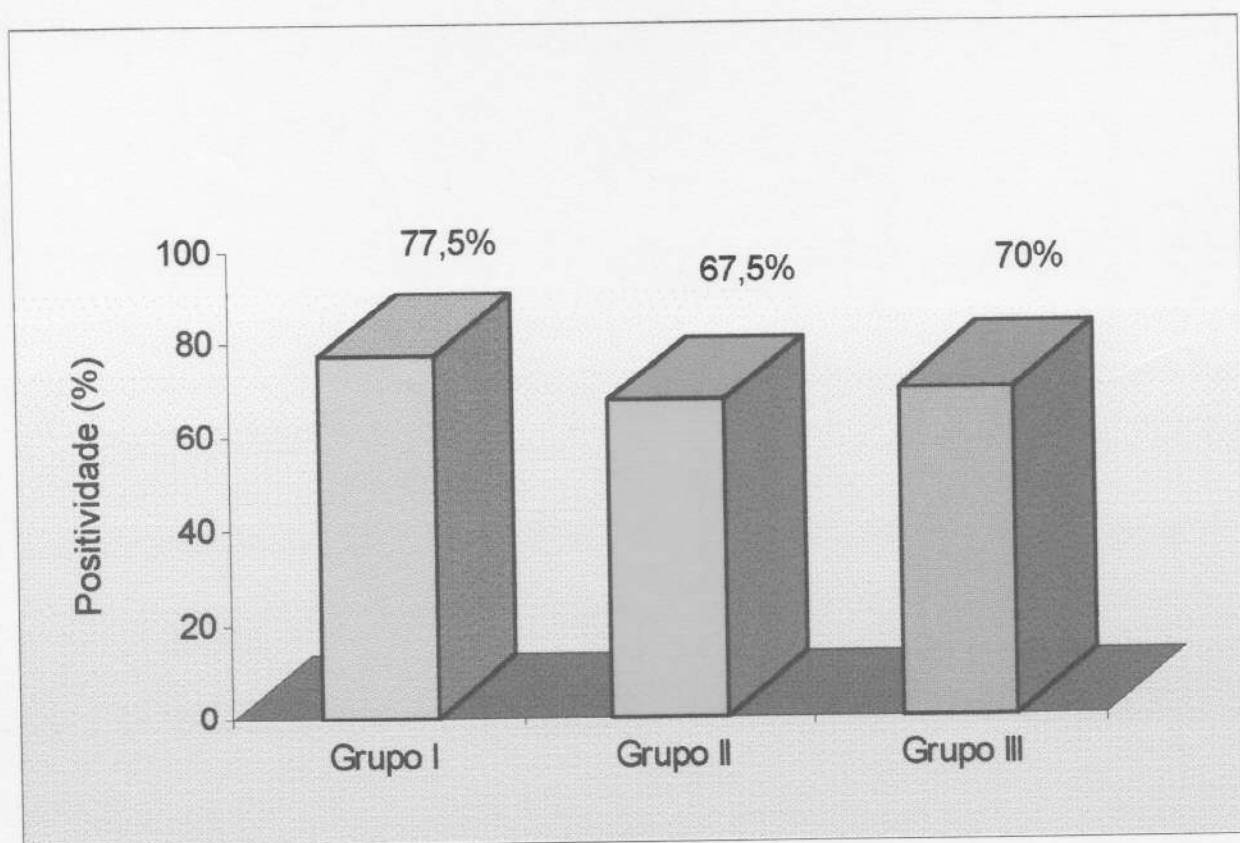


Fig. 4. Percentagem de positividade para IgE sérica total determinada por ELISA em três grupos: grupo I (pacientes com estrogiloidíase, $n = 40$), grupo II (pacientes com outras parasitoses, $n = 40$) e grupo III (indivíduos sadios, $n = 40$).

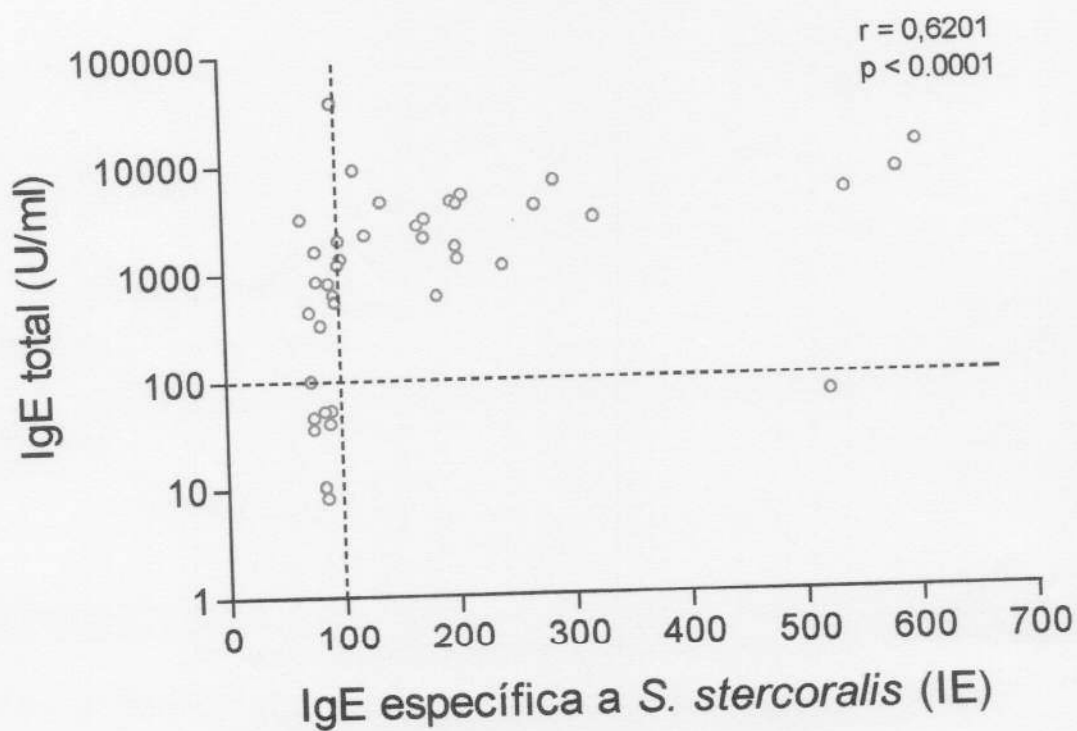


Fig. 5. Correlação entre IgE total (U/ml) e IgE específica a *S. stercoralis* (IE) determinadas por ELISA em amostras de soros do grupo I (pacientes com estrogiloidíase, $n = 40$). A linha tracejada indica o limiar de positividade (*cut off*) para ambos os testes.

5. DISCUSSÃO

A estrogiloidíase é uma parasitose de alta ocorrência no Brasil com várias formas clínicas, incluindo casos de evolução fatal. A aplicabilidade de técnicas parasitológicas e imunológicas podem contribuir para o esclarecimento do diagnóstico clínico da estrogiloidíase, propiciando adequada conduta terapêutica.

A obtenção de larvas de *S. stercoralis* é um fator limitante para o desenvolvimento de testes imunológicos mais específicos, uma vez que é necessário grande quantidade de larvas para obtenção dos extratos antigênicos (ROSSI *et al.*, 1993b). Por isso, tem-se recomendado o uso de antígeno heterólogo de *S. ratti*, devido a sua composição antigênica. Observou-se que esta espécie pode ser utilizada como fonte de antígeno para o diagnóstico sorológico em substituição ao antígeno de *S. stercoralis*, pela facilidade de manutenção em laboratório e pelos resultados semelhantes obtidos.

Para este trabalho foi utilizado o extrato salino heterólogo (*S. ratti*), objetivando a determinação de níveis de IgE anti-*S. stercoralis*.

Os níveis de IgE específica obtidos no grupo de pacientes com estrogiloidíase foram significativamente maiores que no grupo de pacientes com outras parasitoses e grupo de indivíduos sadios. Adicionalmente, a positividade de 55% encontrada nos pacientes com exame parasitológico positivo a *S. stercoralis* foi também significativamente maior que nos pacientes com outras parasitoses (2,5%) e nos indivíduos sadios (17,5%).

Estudo realizado por ATKINS *et al.*, (1997), comparando níveis de IgE específica a *S. stercoralis* em grupos de pacientes na fase aguda e crônica da doença, demonstrou que os pacientes na fase aguda apresentavam maiores níveis de IgE séricos específica do que pacientes na fase crônica ($p < 0,01$), utilizando soros na diluição 1:50.

A alta positividade de IgE específica a *S. stercoralis* encontrada no presente trabalho, sugere que os pacientes do grupo I poderiam estar na fase aguda da doença, visto que elevados níveis de IgE específicos também foram detectados em indivíduos com estrongiloidíase pelo método de RAST (LEÃO *et al.*, 1980).

Mesmo tendo encontrado uma relativa percentagem de positividade para IgE específica a *S. stercoralis* no grupo de indivíduos sadios, tal fato pode ser atribuído à baixa sensibilidade dos testes parasitológico. Além disso, quando o indivíduo já teve contato com o parasita pode apresentar anticorpo, porém não elimina larvas nas fezes.

A maioria dos artigos infocam o teste RAST para a detecção de níveis e positividade de IgE específica a *S. stercoralis*. Porém o RAST é um teste que emprega material radioativo, sendo necessário para sua realização, equipamentos e infra-estrutura em condições específicas. A vantagem do teste ELISA é a sua facilidade em execução e pouca exigência de equipamentos mais sofisticados (GENTA *et al.*, 1988; McRURY *et al.*, 1986; MESSIAS *et al.*, 1987; KORENAGA *et al.*, 1986).

Os níveis de IgE total foram efetivamente maiores para o grupo I (m. g. 866 U/ml) em relação ao grupo II (302 U/ml) e grupo III (313 U/ml), embora a positividade não apresentasse diferenças estatisticamente significantes nos três grupos.

Em 27 pacientes com estrongiloidíase comprovada por método parasitológico, ROSSI *et al.*, (1993b) encontraram que 59% dos pacientes apresentavam elevados níveis de IgE total (concentração média de 1364 UI/ml) pelo teste ELISA. Estudos realizados por MESSIAS *et al.*, (1987) demonstraram que em áreas endêmicas, a elevação de IgE total não é índice para diagnosticar estrongiloidíase. Assim, a positividade de IgE sérica total encontrada nos grupos que foram estudados não contribui significativamente para o diagnóstico de estrongiloidíase. Por outro lado, estes resultados corroboram para o ponto de vista que as técnicas ELISA para detecção de IgE anti-*S. stercoralis* podem ser de grande utilidade para o diagnóstico da estrongiloidíase.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho permite concluir que :

- Os níveis de IgE específica bem como a positividade no grupo de pacientes parasitologicamente positivos para *S. stercoralis* foram superiores aos grupos com outras parasitoses ou de indivíduos sadios .
- Não houve diferença significativa na positividade de IgE total entre os diferentes grupos
- O Teste ELISA para detectar IgE específica em amostras de soros tem valor como auxílio ao diagnóstico e monitoramento da resposta imune na strongiloidíase humana.
- De forma pioneira vem descrever a utilização de antígeno heterólogo para detecção de IgE específica a *S. stercoralis* por ELISA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ANDRADE NETO, J.L. de, ASSEF, M.C.V. Estrongiloidíase. In: VERONESI, R., FOCACCIA, R. (Ed.). **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1997. 1803p. p.1373-1378.
- ARAKAKI, T. *et al.* Efficacy of plate culture in detection of *Strongyloides stercoralis* infection. **J. Parasitol.**, v.76, p.425-428, 1990.
- ASSEFA, T. *et al.* Evaluation of the Baermann's method in the laboratory diagnosis of *Strongyloides stercoralis*. **Ethiop. Med. J.**, v.29, p.193-198, 1991.
- ATKINS, N .S. *et al.* Humoral responses in human strongyloidiasis: correlations with infection chronicity. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.91,p.609-613,1997.
- AVRAM, E. *et al.* Cytologic detection of *Enterobius vermicularis* and *Strongyloides stercoralis* in routine cervicovaginal smears and urocytograms. **Acta. Cytol.**, Baltimore, v.28, p.468-470, 1984.

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

- BAERMANN, G. Eine einfache methode zur auffindung von Ankylostomun (Nematoden) Larven in Erdpnoben. Mededeel. nnith. in. Geneesk. **Lab. Weltrewe Feestbundel Batavia**, p.41-47, 1917.
- BARNISH, G., ASHFORD, R. W. *Strongyloides fulleborni* in Papua New Guinea: epidemiology in an isolated community and results of an intervention study. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.83, p.499-506, 1989.
- BEAL, C. B. *et al.* A new technique for sampling duodenal contents: demonstration of upper small bowel pathogens. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.19, p.349-352, 1970.
- BEZJAK, B. Immunoglobulin studies in strongyloidiasis with special reference to raised serum IgE levels. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.24, p.945-948, 1975.
- BOUREE, P. *et al.* Anguillulose: analyse clinique biologique et epidemiologique de 350 observation. **Nouv. Presse Med.**, v.10, p.679-681, 1981.
- CALICH, V. L. G. , VAZ, C. C. **Imunologia básica**. São Paulo: Artes Médicas. 1988. 376 p.
- CAMPOS, D. M B. *et al.* Antígeno de *Strongyloides cebus* (Darling, 1911) no diagnóstico de estromgiloidíase humana. **Rev. Patol. Trop.**, v.17, p.17-23, 1988.
- CARROL, S. M. *et al.* Serodiagnosis of human strongyloidiasis by an enzyme immunosorbant assay. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.75, p.706-709, 1981.
- CHAVES-BORGES, F. A. C. MINEO, J. R. **Normas de esterilização e medidas de biossegurança**. Uberlândia: EDUFU, 1997. 33p.,
- CHEN, J. J. *et al.* Duodenal *Strongyloides stercoralis* infection. **Endoscopy**, v.26, p.272, 1994.
- CONWAY, D. J. *et al.* Towards effective control of *Strongyloides stercoralis*. **Parasitol. Today**, v.11, p.420-423, 1995.

- COSTA-CRUZ, J. M. *et al.* Cryo-microtome cuts of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.39, p.313-317, 1997.
- COSTA-CRUZ, J. M. *et al.* Padronização do teste ELISA utilizando extratos de *Strongyloides ratti* no diagnóstico da estrogiloidíase humana. In: SEMANA CIENTÍFICA DA MEDICINA da. 11., 1998 Uberlândia., **Anais...**Uberlândia: UFU,1998. p.21.
- COSTA-CRUZ, J. M. *et al.* Padronização do teste ELISA para a detecção de anticorpos IgM, utilizando extratos salino e alcalino de *Strongyloides ratti* no diagnóstico da estrogiloidíase humana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.32 supl.1, p.299, 1999.
- COUDERT, J. *et al.* Diagnostic serologique de l'anguillulose humaine par immunofluorescence (results preliminaires) **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v.61, p.74-80, 1968.
- CUTTI, E., ELOY, A. **Strongyloidiasis en Santa Clotilde (Rio Napo): uso de Baermann modificado en copa para heces y esputo.** UPOCH Faculdade de Medicina Alberto Hurtado, 1992., 49p. Tese, (Doutorado).
- DAFALLA, A. A. The indirect fluorescent antibody test for serodiagnosis of strongyloidiasis. **J. Trop. Med. Hyg.**, v.75, p.109-111, 1972.
- FERREIRA, M. S. Estrogiloidíase. In: VERONESI, R., FOCACCIA, R., DIETZE, R. (Ed.). **Doenças infecciosas e parasitárias**, 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.856-865.
- FERREIRA, M. S. *et al.* Strongyloidiasis and infection due to human immunodeficiency virus: 25 cases at Brazilian teaching hospital, including seven cses of hyperinfeccion syndrome. **Clin. Infect. Dis.**,v.28, p.154-155, 1999.

- GAM, A.A., NEVA, F.A., KROTOSKI, W.A. Comparative sensitivity and specificity of ELISA and IHA for serodiagnosis of strongyloidiasis with larval antigens. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.37, p.157-161, 1987.
- GENTA, R. M. et al. Endemic Strongyloidiasis in northern Italy: Clinical and Immunological aspects. **Quart. J. Med.**, v.28, p. 679-690, 1988.
- GENTA, R. M. Predictive value of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of strongyloidiasis. **Amer. J. Clin. Pathol.**, v.89, p.391-394, 1987.
- GENTA, R. M. Global seroprevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into prevention of disseminated disease. **Rev. Infect. Dis.**, v.2, p.755-767, 1989.
- GENTA, R. M., WELL, G. J. Antibodies to *Strongyloides stercoralis* larval surface antigens in chronic strongyloidiasis. **Lab. Invest.**, v.47, p.87-90, 1982.
- GOMES, M. C. **Mecanismos patológicos relacionados a auto-endo-infecção na estrogiloidose humana fatal**. Salvador: Universidade Federal da Bahia. Centro Editorial e Didático, 1981.35p.il.
- GOMES-MORALES, M. et al. Opportunistic and non-opportunistic parasites in HIV-positive and negative patients with diarrhoea in Tanzania. **Trop. Med. Parasitol.**, v.46, n.2, p.109-114, 1995.
- GROVE, D. I. Human strongyloidiasis. **Adv. Parasitol.**, v.38, p.251-309, 1996.
- GROVE, D. I., BLAIR, A. J. Diagnosis of human strongyloidiasis by immunofluorescence, using *Strongyloides stercoralis* larvae. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.30, p.344-348, 1981.
- HALL, A. et al. *Strongyloides stercoralis* in an urbana slum community in Bangladesh: fator independently associated with infection. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, p. 527-530, 1994.

- HOFFMANN, W. A., PONS, J. A., JANER, J. L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni, Puerto Rico. **J. Publ. Health. Trop. Med.**, v.9, p.283-291, 1934.
- HUARATO SEDDA, M. *et al.* Study of *Strongyloides stercoralis* in the duodenal juice obtained by the examination of a string capsule or the Enterotest. **Rev. Gastroenterol.**, v.10, p.107-110, 1990.
- JONES, C. A., ABADIE, S. H. Studies in human strongyloidiasis: a comparison of the efficiency of diagnosis by examination of feces and duodenal fluid. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.24, p. 1154-1158, 1954.
- KAMINSKY, R. G. de Evaluation of three methods for laboratory diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **J. Parasitol.**, v.79, n.2, p.2 77-280, 1993.
- KOGA, K. *et al.* A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v.45, p.518-521, 1991.
- KOGA, K. *et al.* How effective is the agar plate method for *Strongyloides stercoralis*?. **J. Parasitol.**, v.78, p.155-156, 1992.
- KORENAGA, M., NAWA, Y., TADA, I., IgE response in *Strongyloides ratti*- infected rats with special reference to the life cycle of the parasite **Z. Parasitenkd.**, v. 72 p.213-220, 1986.
- LEÃO, R. C. *et al.* Immunological study of human strongyloidiasis. I. Analysis of IgE levels. **Allergol. Immunopathol.**, v.8, n.31, p.31-34. 1980.
- LEVINE, N. D. **Nematode parasites of domestic animals and of man**. 2. ed. Minneapolis: Burges, 1979. p.42-43
- LINDO, J. F. *et al.* Prospective evaluation of ELISA and immunoblot methods for the diagnosis of endemic *Strongyloides stercoralis* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.51, p.175-179, 1994.

- LINDO, J. F. *et al.* long-term serum antibody isotype responses to *Strongyloides stercoralis* filariform antigens in eight patients treated with ivermectin. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**; v.55, p. 474-476, 1996.
- LOWRY, V. H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.29, p.265-275, 1951.
- LUTZ, A. J. *Schistosoma mansoni* e a schistosomose, segundo observações feitas no Brasil. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v.11, p.121-125, 1919.
- MACHADO, E. R., COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v.93, p.161-164, 1998.
- MAHDI, N. K. *et al.* Diagnostic methods for intestinal parasites in southern Iraq with reference to *Strongyloides stercoralis*. **J. Trop. Med. Public Health**, v.124, p.685-691, 1993.
- MALE, D., STEWARD, M. Técnicas imunológicas. In: ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. (Ed.). **Imunologia**. 4.ed. São Paulo: Manole, 1997. p.286.
- MANGALI, A. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human strongyloidiasis. **J. Trop. Pub. Health**, v.22, p.88-92, 1991.
- McRURY, J. *et al.* Specific IgE response in human strongyloidiasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v.65, p.631-638, 1986.
- MESSIAS, J. T. *et al.* Clinical, immunological and epidemiological aspects of strongyloidiasis in an endemic area of Brazil, **Allergol. Et immunopathol.**, v.15, n.1, p.37-41, 1987.
- MILDER, J. E. *et al.* Clinical features of *Strongyloides stercoralis* infection in an endemic area of United States. **Gastroenterology**, v.80, p.1481-1488, 1981.

- MORAES, R. G. Contribuição para o estudo de *Strongyloides stercoralis* e da estrongiloidíase no Brasil. **Rev. Serv. Esp. S. Pub.**, v.1, p.507-524, 1948.
- MURTY, D. A. *et al.* Cytologic detection of *Strongyloides stercoralis* in a routine cervicovaginal smear. Case report. **Acta Cytol.**, v.39, p.223-225, 1994.
- NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia humana**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1995. 524p. Cap.52: exame parasitológico de fezes, p.485-495.
- PELLEGRINO, J. *et al.* Observações sobre reação intradérmica com antígeno de *Strongyloides ratti* em pacientes com estrongiloidíase. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.3, p.181-186, 1961.
- PÊSSOA, S. B., MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. Cap.46: Superfamília Rhabdisoidea- *Strongyloides stercoralis* e estrongiloidose, p. 507-515.
- PIRES, M. L., DREYER, G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo**, v.48, p.175-182, 1993.
- POLLART, S. *et al.* Epidemiology of acute asthma: IgE antibodies to common inhalant allergens as a risk factor for emergency room visits. **J. Allergy Clin. Immunology.**, v.83, p. 875-882, 1989.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D., **Imunologia**. 4.ed. São Paulo: Manole, 1997. Cap.4: Anticorpos e seus receptores.p.412.
- ROSSI, C. L. *et al.* Avaliação de preparações antigênicas de *Strongyloides stercoralis* para o imunodiagnóstico da estrongiloidíase. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.26, n.2, p.83-87, 1993a.
- ROSSI, C. L. *et al.* Total serum IgE and parasite-specific IgG and IgA antibodies in human strongyloidiasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.35, n.4, p.361-365, 1993b.

- SALAZAR, D. A. *et al.* Value of the agar plate method for the diagnosis of intestinal strongyloidiasis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.23, p.141-145, 1995.
- SANTOS, J. I., PADILHA FILHO, O. Baixa sensibilidade do método de cultura de larvas (Harada-Mori) no diagnóstico de estrogiloidíase. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.29, p.51-52, 1996.
- SATO, Y., KOBAYASHI, J., SHIROMA, Y. Serodiagnosis of strongyloidiasis. The application and significance. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.37, p.35-41, 1995.
- SATO, Y. *et al.* Efficacy of stool examination for detection of strongyloidiasis infection. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v.53, p.248-250, 1995b.
- STUERCHLER, D. Endemiegebiete tropischer infektionskrankheiten. **Bern, Hans. Huber.** 1981.
- SUKHAVAT, K. *et al.* Comparative efficacy of four methods for the detection of *Strongyloides stercoralis* in human stool specimens. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.88, p.95-96, 1994.
- TAKAYANAGUI, O. M. *et al.* Detection of *Strongyloides stercoralis* in the cerebrospinal fluid of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **Neurology.**, v.45, p.193-194, 1995.

8. ANEXO**Termo de Consentimento**

Eu _____ Doc. n°

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

Assinatura do reponsável

UBERLÂNDIA, ____ DE _____ DE 199__.

8. ANEXO**Termo de Consentimento**

Eu _____ Doc. _____ nº _____

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

Assinatura do responsável

UBERLÂNDIA, ____ DE _____ DE 199__.