



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LARISSA RODRIGUES BOSQUI

**DIAGNÓSTICO COPROPARASITOLÓGICO, IMUNOLÓGICO  
E MOLECULAR DA ESTRONGILOIDÍASE EM PACIENTES  
PORTADORES DE TUBERCULOSE**

---

Londrina  
2019

LARISSA RODRIGUES BOSQUI

**DIAGNÓSTICO COPROPARASITOLÓGICO, IMUNOLÓGICO  
E MOLECULAR DA ESTRONGILOIDÍASE EM PACIENTES  
PORTADORES DE TUBERCULOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Patologia Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Idessania Nazareth Costa

Londrina  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

BOSQUI, LARISSA RODRIGUES.

DIAGNÓSTICO COPROPARASITOLÓGICO, IMUNOLÓGICO E MOLECULAR DA ESTRONGILOIDÍASE EM PACIENTES PORTADORES DE TUBERCULOSE / LARISSA RODRIGUES BOSQUI. - Londrina, 2019.

146 f. : il.

Orientador: IDESSANIA NAZARETH COSTA.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2019.

Inclui bibliografia.

1. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO - Tese. 2. ESTRONGILOIDÍASE HUMANA - Tese. 3. SALIVA - Tese. 4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR - Tese. I. NAZARETH COSTA, IDESSANIA . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . III. Título.

LARISSA RODRIGUES BOSQUI

**DIAGNÓSTICO COPROPARASITOLÓGICO, IMUNOLÓGICO E  
MOLECULAR DA ESTRONGILOIDÍASE EM PACIENTES  
PORTADORES DE TUBERCULOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Patologia Experimental.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Idessania Nazareth  
Costa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Luiz Antonio Custodio  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Francisco José de Abreu Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves  
Fernandes  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Maria Angélica Ehara Watanabe  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 12 de abril de 2019.

Dedico este trabalho a todos os pacientes que aceitaram voluntariamente participar deste estudo, e aqueles que depositam diariamente suas esperanças em nós pesquisadores.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Idessania Nazareth Costa não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade e trajetória trilhada ao meu lado por longos e saudosos seis anos. Sua dedicação e eficiência em tudo que faz, me inspira.

Aos professores da Parasitologia, em especial, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivete Conchon Costa por todo conhecimento recebido ao longo dos anos, e por sua paixão pela parasitologia clínica, ao Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli por todo conhecimento científico e Prof. Dr. Francisco José de Abreu Oliveira por ser referência em diagnóstico parasitológico e me ensinar tanto.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Martins de Paula por toda parceria e colaboração com as análises moleculares e dedicada correção, e toda equipe do Laboratório de Moléstias Infecciosas e Parasitárias - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial aos doutorandos Gêssica Melo e Marcelo Corral por colaborarem mesmo com toda distância.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Julia Maria Costa Cruz por colaborar com a realização do diagnóstico imunológico, e toda equipe do Laboratório de Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia – MG, em especial ao Dr. Henrique Tomaz Gonzaga, por sua ajuda com as análises estatísticas.

À toda equipe do Ambulatório de Especialidades e Hospital Universitário de Londrina, em especial os coordenadores Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia Hideko Tatakihara e Prof. Valter Abou Murad e ao técnico de laboratório e amigo Ruy Cesar Saviani.

Agradeço ao chefe de coleta, professor, e amigo Prof. Dr. Luiz Antonio Custodio, por todo apoio, co-orientação e ensinamento ao longo dos anos, sua participação ativa foi de extrema importância.

Aos técnicos de departamento Pedro e Aderaldo por estarem sempre dispostos a ensinar.

Ao ambulatório de Tuberculose que é referência em todo o estado, Centro de Referência Dr. Bruno Piancastelli Filho, por todo acolhimento à nossa equipe e pelo excelente trabalho prestado. Agradeço as enfermeiras Salete e

Samara e aos médicos Fábio Crespo e Francisco Araújo por acreditar em nossa pesquisa.

Ao médico Wilson Liuti Costa Júnior, responsável pelo Centro de Testagem e Aconselhamento de Cambé e as enfermeiras Marinês, Sandra e Dagmar por todo ensinamento e carinho o qual nos acolheram.

À Secretaria de Saúde de Londrina e Ibiporã e Unidades Básicas de Saúde, pela parceria e eficiência junto às pesquisas de extensão desenvolvidas.

Aos secretários da Patologia, Sérgio e Tatiana, pela atenção e ajuda prestada.

Ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina e CAPES pelo incentivo à pesquisa e apoio institucional. E a todos os professores que ministraram as disciplinas do programa, meu muito obrigada por contribuírem com a minha formação.

À todos os amigos do Laboratório de Imunoparasitologia das Doenças Negligenciadas e Câncer, no qual tive a oportunidade de conviver por esses oito anos de caminhada. Agradeço em especial, o grupo *Strongy/Toxo*: Raquel Sanfelice, Laís Machado, Gabriela Alcântara, Sara Lopes, Giovanna Oliveira, Gabriela Oliveira, Camila Zanfrillini e Ana Carolina Polvani.

Agradeço antemão aos professores doutores Luiz Antonio Custodio, Francisco José de Abreu Oliveira, Glaura Scantamburlo A. Fernandes e Maria Angélica Ehara Watanabe que aceitaram gentilmente compor a banca, contribuindo de forma essencial para a melhoria do trabalho.

Aos meu familiares, tios, avós, primos e amigos que sempre torceram insensatamente pela minha vitória.

Meu esposo Ricardo por todo apoio, paciência e incentivo, e principalmente por seu amor, compreendendo minha ausência inúmeras vezes.

Meus amados pais, Marta e Regis, que mesmo com pouco estudo, fizeram o possível e impossível para que aqui chegasse. Sou eternamente grata a vocês.

Por fim, mas não por último, Àquele que quieta o meu coração e me mostra a direção, não permitindo que eu me afastasse do meu propósito. Deus do impossível, do amor incondicional, meus mais sinceros agradecimentos.

*“Nós somos o produto daqueles que nos ensinaram, nos deram  
oportunidades e chances, daqueles que nos inspiram.”*

**Thomas Keller**

BOSQUI, Larissa Rodrigues. **Diagnóstico coproparasitológico, imunológico e molecular da estrogiloidíase em pacientes portadores de tuberculose**. 2019. 146 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

Casos de pacientes com coinfeção de tuberculose e estrogiloidíase são pouco estudados e relatados. No entanto, ambos quadros patológicos possuem cenário relevante na epidemiologia da saúde pública apresentando populações vulneráveis coincidentes. Diante do aumento da incidência de tuberculose em regiões tropicais e subtropicais, regiões nas quais existe uma alta prevalência de parasitas gastrointestinais, sobretudo da estrogiloidíase, nosso objetivo foi realizar o diagnóstico coprológico, imunológico e molecular da estrogiloidíase humana. Para isso, aprimoramos o diagnóstico sorológico e salivar através da detecção de imunocomplexos IgG anti – *S. stercoralis*. Além disso, através de um teste rápido e sensível, Dot-ELISA, realizamos o diagnóstico salivar para detecção de IgA específico. Utilizando a biologia molecular, foi possível comparar o diagnóstico imunológico, soro e saliva, com o diagnóstico molecular nas fezes, através de dois primers, gênero e espécie específico. A partir desses dados, realizamos um estudo epidemiológico, descritivo e retrospectivo e incluímos os pacientes com tuberculose, no diagnóstico imunológico e molecular. Calculamos através do software GraphPad, área sob a curva, índice geral de acurácia diagnóstica, índice Kappa e as correlações entre os diferentes testes diagnósticos. Para o teste de quimiluminescência os resultados foram interpretados com a ajuda do programa Image Quant. Nossos resultados demonstraram que, a detecção de imunocomplexos IgG no soro foi de 3% (n=30) para o grupo I (indivíduos saudáveis) e 93% (n=30) para o grupo II (copropositivos para *S. stercoralis*), enquanto que, para a saliva, a detecção foi de 20% grupo I e 30% grupo II. O Dot-ELISA para detecção de IgA na saliva em pacientes positivos para *S. stercoralis* (n=10), apresentou resultados semelhantes ao teste ELISA, com sensibilidade de 70% e 60% e especificidade de 85% e 90%, respectivamente. A comparação entre o diagnóstico imunológico e molecular demonstrou que 97,1% dos 35 indivíduos copropositivos para *S. stercoralis* foram positivos para IgG sérica e 19 54,3% foram positivos para IgA salivar. Em relação à análise molecular, ambos os primers demonstraram positividade em 100% das amostras. Dos prontuários disponíveis para a análise dos pacientes, 86 casos eram positivos para tuberculose, sendo a maioria do sexo masculino (76%) com faixa etária entre 2 e 91 anos. Os principais sinais clínicos apresentados foram tosse, febre e perda de peso. Em relação à forma clínica, 67% dos pacientes apresentaram a forma pulmonar, e 33% a forma não pulmonar. Casos positivos para tuberculose em associação com HIV/AIDS corresponderam a 37%. Em relação ao imunodiagnóstico em pacientes portadores de tuberculose, a detecção de IgA foi de 34% para o grupo I (n=50) e 66% para o grupo II (n=50), na saliva. Enquanto que IgG na saliva para o grupo I foi de 46% e IC-IgG 38%. Já no grupo II foi de 52% e 62%, respectivamente. No soro observamos 36% de positividade para IgA no grupo I e 60% grupo II. Em relação a detecção de IgG e IC-IgG no soro, grupo I foi de 46% e 34%, respectivamente. No Grupo II 58% para IgG e 68% para IC-IgG. Quanto ao diagnóstico molecular, a positividade foi de 30,7%

(16/52), tanto pela qPCR quanto pela cPCR. Os valores de Cts variaram de 32.6-40.9 (média 38.2). Com isso, o uso do diagnóstico molecular juntamente com o imunodiagnóstico, podem ser considerados como uma ferramenta complementar na triagem da estrogiloidíase, especialmente, considerando a gravidade da coinfeção neste grupo de pacientes. Casos de pacientes em coinfeção com tuberculose e estrogiloidíase são pouco estudados e relatados, no entanto, a realização de exames que complementem o diagnóstico rápido e preciso dessas infecções são essenciais para o bom prognóstico dos pacientes.

**Palavras-chave:** Estrogiloidíase. Tuberculose. Imunodiagnóstico. Saliva. qPCR.

BOSQUI, Larissa Rodrigues. **Copro-parasitological, immunological and molecular diagnosis of strongyloidiasis in patients with tuberculosis.** 2019. 146 p. Thesis (Doctorate Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

Cases of patients with co-infection of tuberculosis and strongyloidiasis are poorly studied and reported; however, both pathologies have a relevant scenario in the epidemiology of public health, presenting vulnerable populations. In view of the increased incidence of tuberculosis in tropical and subtropical regions, where there is a high prevalence of gastrointestinal parasites, especially strongyloidiasis, our objective was to carry out the coprological, immunological and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. For this, we improved the serological and salivary diagnosis through the detection of immunocomplex IgG anti - *S. stercoralis*. In addition, through a rapid and sensitive Dot-ELISA test, we performed the salivary diagnosis for specific IgA detection. Using molecular biology, it was possible to compare the immunological diagnosis, serum and saliva, and the molecular diagnosis in the feces, through two primers, genus and specific species. From these data, we conducted an epidemiological, descriptive and retrospective study and included patients with tuberculosis, both in immunological and molecular diagnosis. We calculated using the GraphPad software, area under the curve, general index of diagnostic accuracy, Kappa index and correlations between the different diagnostic tests. For the chemiluminescence test the results were interpreted using the Image Quant program. Our results demonstrated that the detection of serum IgG immunocomplexes was 3% for group I (healthy individuals) (n=30) and 93% for group II (copropositives for *S. stercoralis*) (n=30), whereas, for saliva, the detection was of 20% group I and 30% group II. The Dot-ELISA for the detection of IgA in saliva in *S. stercoralis* positive patients (n=10), presented results similar to the ELISA test, with sensitivity of 70% and 60% and specificity of 85% and 90%, respectively. The comparison between immunological and molecular diagnosis showed that 97.1% of the 35 copropositive individuals for *S. stercoralis* were positive for serum IgG and 19 54.3% were positive for salivary IgA. In relation to the molecular analysis, both primers demonstrated positivity in 100% of the samples. From the charts available for the patients analysis of the patients, 86 cases were positive for tuberculosis, the majority being male (76%) with ages ranging from 2 to 91 years. The main clinical signs presented were cough, fever and weight loss. Regarding the clinical form, 67% of the patients presented the pulmonary form, and 33% the non-pulmonary form. Positive cases for tuberculosis in association with HIV/AIDS accounted for 37%. Regarding immunodiagnosis in patients with tuberculosis, the IgA detection was 34% for group I (n=50) and 66% for group II (n=50), in saliva. While saliva IgG for group I was 46% and 38% for IC-IgG. In group II, it was 52% and 62%, respectively. In serum we observed 36% positivity for IgA in group I and 60% group II. Regarding the detection of IgG and IC-IgG in saliva, group I was 46% for IgG and 34% for IC-IgG. In Group II 58% for IgG and 68% for IC-IgG. Regarding the molecular diagnosis, the positivity was 30.7% (16/52), both by qPCR and by cPCR. Cts values ranged from 32.6-40.9 (mean 38.2). Therefore, the use of molecular diagnostics and immunological diagnosis can be considered as a complementary tool in the screening of

strongyloidiasis, especially considering the severity of coinfection in this group of patients. Cases of patients in co-infection with tuberculosis and strongyloidiasis are poorly studied and reported; however, examinations that complement the rapid and accurate diagnosis of these infections are essential for the good prognosis of patients.

**Key words:** Strongyloidiasis. Tuberculosis. Immunodiagnosis. Saliva. PCR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Ciclo de vida de <i>Strongyloides stercoralis</i> .....	16
<b>Figura 2</b> – Interações celulares na resposta imune para helmintos .....	23
<b>Figura 3</b> – Secreção e componentes da IgA .....	27
<b>Figura 4</b> – Reconhecimento bacteriano.....	38
<b>Figura 5</b> – Mapa-múndi: coinfeção entre helmintos e tuberculose .....	40
<b>Figura 6</b> – Histórico da Pesquisa.....	51

## SUMÁRIO

1			
2	<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
3	1.1.	Aspectos taxonômicos e morfo-biológicos da estrogiloidíase	
4		humana.....	14
5	1.2.	Epidemiologia da estrogiloidíase humana .....	17
6	1.3.	Imunopatogenicidade da estrogiloidíase .....	21
7	1.4.	Diagnóstico da estrogiloidíase .....	29
8	1.4.1.	Diagnóstico parasitológico.....	29
9	1.4.2.	Diagnóstico imunológico.....	30
10	1.4.3.	Utilização da saliva como ferramenta alternativa no diagnóstico da	
11		estrogiloidíase.....	32
12	1.4.4.	Diagnóstico molecular .....	34
13	1.5.	Etiopatogenia da tuberculose e seus desafios .....	36
14	1.5.1.	Epidemiologia, diagnóstico e tratamento da tuberculose.....	39
15	1.5.2.	Efeito da imunidade induzida por helmintos em infecções	
16		microbianas .....	44
17			
18	<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	47
19			
20	<b>3</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	49
21			
22	3.1.	Objetivos específicos.....	49
23			
24		<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	52
25			
26	<b>4</b>	<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA</b> .....	73
27	4.1.	ARTIGO 1: Immune complex detection in saliva samples: an	
28		innovative proposal for the diagnosis of human strongyloidiasis .....	73
29	4.2.	ARTIGO 2: Evaluation of the Dot-ELISA as a diagnostic test for	
30		human strongyloidiasis based on the detection of IgA in saliva .....	74

1	4.3.	ARTIGO 3: Molecular and Immune Diagnosis: Further Testing for	
2		Human Strongyloidiasis .....	86
3	4.4.	ARTIGO 4: Clinical profile of patients diagnosed with tuberculosis	
4		treated at the University Hospital of Londrina, Paraná.....	87
5	4.5.	ARTIGO 5: Imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana utilizando	
6		amostras pareadas de saliva e soro na detecção de IgA, IgG e	
7		imunocomplexo-IgG em pacientes portadores de tuberculose	
8		pulmonar.....	88
9	4.6.	ARTIGO 6: DNA ribossomal de <i>Strongyloides stercoralis</i> em	
10		pacientes com tuberculose .....	104
11			
12		<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	119
13			
14	<b>5</b>	<b>ANEXOS</b> .....	120
15	5.1.	Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa em	
16		Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina .....	120
17	5.2.	Aquiescência da Direção da Unidade Básica de Saúde de Londrina	
18		para realização do estudo .....	121
19	5.3.	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	122
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			

# 1 1 INTRODUÇÃO

## 3 1.1. Aspectos taxonômicos e morfo-biológicos da estrogiloidíase humana

5 A estrogiloidíase, infecção causada pelo nematódeo *Strongyloides*  
6 *stercoralis* (BAVAY, 1876) infecta cerca de 370 milhões de pessoas em 70 países,  
7 com predominância em regiões tropicais e subtropicais, podendo ser encontrado  
8 esporadicamente em regiões temperadas (SIDDIQUI; BERK, 2001; LAM et al.,  
9 2006; SUDRÉ et al., 2006, VERDONCK et al., 2007; BISOFFI et al., 2013).

10 A estrogiloidíase é considerada uma parasitose de condição negligenciada,  
11 e possui distribuição heterogênea, com áreas de predominância do sudoeste da  
12 Ásia, Brasil, Colômbia, Leste Europeu, Oeste da África e algumas ilhas do Caribe.  
13 Na Europa a infecção prevalece em agricultores, hortigranjeiros e trabalhadores  
14 rurais e nos países tropicais, a doença atinge principalmente crianças pela  
15 frequente permanência em solos contaminados (PIRES; DREYER, 1993;  
16 RODRIGUEZ et al., 2001; COSTA-CRUZ, 2005; 2016; BOULWARE et al., 2007;  
17 FARDET et al., 2007). Nas Américas, é encontrada desde o Canadá até Argentina  
18 e Chile. Focos com elevada endemicidade são encontrados em países como  
19 Colômbia com 20% de positividade e no Peru com 48% (REY, 2001; MERCADO et  
20 al. 2007).

21 No Brasil, a importância de *S. stercoralis* como agente etiológico da  
22 estrogiloidíase ou anguilulose, foi salientada primeiramente por Ribeiro da Luz em  
23 1880. A partir de então, estudos têm sido realizados demonstrando variações na  
24 prevalência dessa parasitose em decorrência de vários fatores, tais como idade,  
25 diferenças geográficas e socioeconômicas (GENTA, 1989; PAULA; COSTA-CRUZ,  
26 2011).

27 *Strongyloides* sp. pertence ao reino Metazoa, filo Nematoda, classe  
28 Secernentea, ordem Rhabditida, família Strongyloididae (YAMAGUT, 1961). O  
29 gênero *Strongyloides* apresenta 52 espécies das quais somente duas tem  
30 importância clínica para o homem: *S. stercoralis* e *S. fuelleborni* Von Linstow  
31 (1905). A primeira espécie tem distribuição mundial, especialmente nas regiões

1 tropicais, podendo também infectar cães, gatos e macacos, a segunda é  
2 encontrada na África e nas Filipinas. A subespécie, *Strongyloides fuelleborni kellyi*  
3 foi descrita pela primeira vez parasitando crianças residentes na Papua Nova  
4 Guiné (GROVE, 1996; SHARIATI et. al., 2010). Como modelo experimental em  
5 roedores, a utilização das espécies *Strongyloides ratti* e *Strongyloides venezulensis*  
6 tem auxiliado nos estudos de biologia molecular, interação parasito-hospedeiro,  
7 ensaios terapêuticos além de ser fonte de antígeno heterólogo para padronização  
8 de novas metodologias no imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana (Costa-  
9 Cruz IN: NEVES et.al., 2011; GONZAGA et al., 2011; GONÇALVES et al., 2012a).

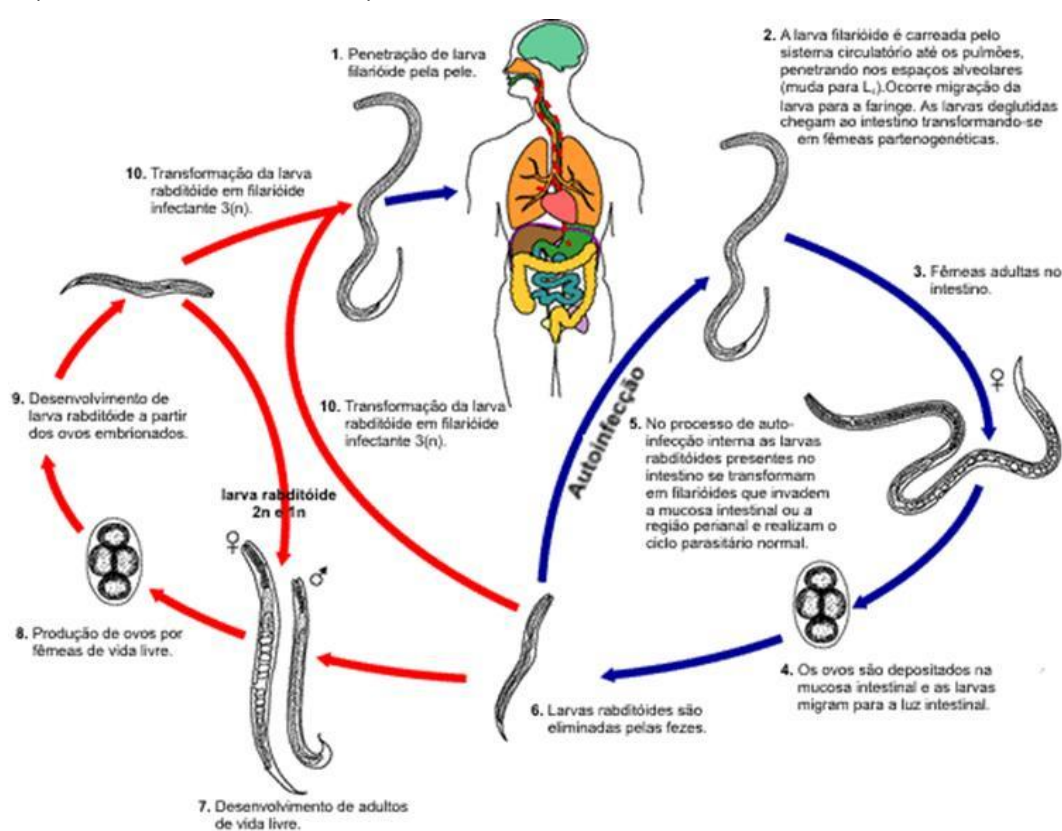
10 *S. stercoralis* apresenta seis formas evolutivas: fêmea partenogenética  
11 parasita e fêmea de vida livre, macho de vida livre, ovos e larvas rabditóide e  
12 filarioide (Costa-Cruz IN: NEVES et.al., 2011).

13 No homem a infecção ocorre pela penetração ativa das larvas filarioides (L3)  
14 na pele íntegra, ou ocasionalmente, através das mucosas, principalmente da boca  
15 e do esôfago, quando são deglutidas acidentalmente através de alimentos  
16 contaminados, essas larvas secretam metaloproteases, enzimas que auxiliam na  
17 penetração e migração através dos tecidos (MARUYAMA et. al., 2006). Em seguida  
18 as larvas ao atingirem a corrente sanguínea migram até os alvéolos pulmonares e  
19 destes ascendem pela traqueia onde são deglutidas, alcançando o intestino  
20 delgado onde irão completar seu desenvolvimento (GROVE, 1996; Costa-Cruz IN:  
21 NEVES et.al., 2011).

22 As larvas se diferenciam em fêmeas partenogenéticas, alojando-se nas  
23 criptas de Lieberkühn e na porção superior do jejuno, onde fazem a postura. Os  
24 ovos liberados pelas fêmeas atingem rapidamente a maturidade e as larvas  
25 rabditoides (que eclodem dos ovos) migram para a luz intestinal, sendo desta forma  
26 eliminada nas fezes (PIRES; DREYER, 1993; FERREIRA; COSTA-CRUZ, 2003).

27 No ciclo direto, as larvas rabditoides presentes no solo ou na região perianal,  
28 se diferenciam em larvas filarioides infectantes (L3), enquanto que, no ciclo indireto  
29 as larvas rabditoides passam por quatro diferenciações no solo, e após 18 a 24  
30 horas produzem fêmeas e machos de vida livre (Figura 1) (Costa-Cruz IN: NEVES  
31 et.al., 2011; SCHÄR et al., 2013).

1 A carga cromossômica  $n$ ,  $2n$  e  $3n$  correspondente a machos, fêmeas de vida  
 2 livre e às larvas filarioides respectivamente, ocorre a partir da oogênese para a  
 3 definição do sexo da larva rabditoides. Infecções mais recentes garantem um  
 4 grande número de larvas infectantes L3, que facilitam a reinfecção contínua do  
 5 hospedeiro, já as infecções crônicas favorecem o ciclo indireto, garantindo uma  
 6 fonte de L3 por longos períodos de tempo, embora a taxa de produção seja mais  
 7 baixa (SHIWAKU et. al., 1988).



8  
 9 **Figura 1. Ciclo de vida.** O ciclo vital da strongiloidíase humana ocorre parte no solo, onde se  
 10 encontram fêmeas e machos, e parte como parasitas teciduais da parede intestinal, onde só há  
 11 fêmeas partenogênicas. Estas produzem ovos já embrionados contendo larvas rabditóides, L1,  
 12 que deixam a mucosa e saem com as fezes. No solo elas se diferenciam em machos e fêmeas que  
 13 fecundam ovos contendo larvas L1. As larvas L1, de ambas origens, transformam-se no solo em L2  
 14 ou larvas filarioides infectantes, capazes de penetrar através da pele humana (Adaptado de CDC).  
 15

16 A interação entre *S. stercoralis* e o hospedeiro humano é complexa em  
 17 decorrência de sua capacidade intrínseca de reprodução, existindo em indivíduos  
 18 infectados três possibilidades de evolução: a erradicação da infecção, a  
 19 cronicidade decorrente da autoinfecção e a possibilidade de hiperinfecção ou  
 20 disseminação (COSTA-CRUZ, 2005; 2016).

1 Mecanismos da autoinfecção externa ou exógena e autoinfecção interna ou  
2 endógena são comuns na transmissão da estrogiloidíase, sendo que no primeiro  
3 as larvas rabditoides presentes na região perianal, diferenciam-se em larvas  
4 filarioides infectantes que aí penetram, completando o ciclo direto. No mecanismo  
5 de autoinfecção interna, larvas rabditoides, ainda presentes na luz intestinal (íleo  
6 ou cólon) de indivíduos infectados, se diferenciam em larvas filarioides. Através  
7 desse mecanismo a doença pode manter-se crônica por meses ou anos  
8 (FERREIRA et al., 1999; REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2005; 2016).

9 A maioria dos indivíduos infectados são assintomáticos, porém, em casos  
10 mais graves da estrogiloidíase, pode ocorrer a Síndrome de Löffler, resultando em  
11 edema pulmonar e insuficiência respiratória (PIRES; DREYER, 1993; COSTA-  
12 CRUZ, 2011).

13 O tratamento de estrogiloidíase é limitado às formulações orais como  
14 Ivermectina, Albendazol e Tiabendazol. A Ivermectina foi aprovada pelo Food and  
15 Drug Administration (FDA) em 1997 para o tratamento de estrogiloidíase,  
16 posteriormente aprovado no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
17 (ANVISA), visto que em vários estudos a mesma se mostrou com maior eficácia e  
18 segurança, além de apresentar menores efeitos colaterais e maior adesão do  
19 medicamento, sendo, portanto, o medicamento de primeira escolha para  
20 estrogiloidíase (HUGGINS et al., 2001; ZAHA et al., 2002; MENDES et al., 2017).

21

## 22 **1.2. Epidemiologia da estrogiloidíase humana**

23 As helmintíases apresentam elevada prevalência mundial em continentes  
24 como Ásia, África e América Latina, onde aproximadamente 820 milhões de  
25 pessoas estão infectadas por *Ascaris lumbricoides*, 460 milhões por *Trichuris*  
26 *trichiura* e 440 milhões por ancilostomídeos, seguidos pelas contaminações por  
27 outros geohelminhos (OPAS, 2018). Dentre as infecções causadas por  
28 geohelminhos, a estrogiloidíase está entre as primeiras. Esta posição refere-se  
29 apenas às infecções ativas, uma vez que o número de pessoas potencialmente  
30 expostas com quadro de infecção sub-clínico é muito maior (ELLIOT; SUMMERS;  
31 WEINSTOCK, 2007).

1 Foi definido por Stuerchler (1981 apud PIRES; DREYER, 1993) as regiões  
2 mundiais de acordo com a prevalência da infecção por *S. stercoralis*: esporádica  
3 (<1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%). As áreas hiperendêmicas estão  
4 situadas, principalmente, entre os trópicos, especialmente nos países em  
5 desenvolvimento da Ásia, América Latina e África Subsaariana (FARDET et al.,  
6 2007; DEVI; BORKAKOTY; MAHANTA, 2011).

7 Estima-se que a infecção pelo *S. stercoralis* atinja de 10 a 40% da população  
8 residente de países tropicais e subtropicais, e em países com condições sanitárias  
9 precárias e também socioeconômicas a taxa de infecção pode chegar a 60%  
10 (SCHÄR et al., 2013; COSTA-CRUZ, 2016). Além disso, têm-se notado um  
11 aumento no número de casos de estrogiloidíase humana em países  
12 desenvolvidos devido ao crescente número de imigrantes, viajantes e refugiados  
13 (PAGE; SPEARE, 2016).

14 Nas regiões desenvolvidas do mundo, como Sudeste da América do Norte e  
15 Europa, as infecções são frequentes em trabalhadores do campo e também tem  
16 origem não autóctone em razão dos imigrantes e visitantes de áreas endêmicas  
17 (SIDDIQUI; BERK, 2001; MARCOS et al., 2008). Nestas regiões as infecções  
18 helmínticas, incluindo a estrogiloidíase, podem ser controladas por programas de  
19 atenção básica à saúde e medidas de saneamento efetivo (PAULA; COSTA-CRUZ,  
20 2011).

21 No período entre 1990 a 2009, a ocorrência da infecção por *S. stercoralis* no  
22 Brasil foi de aproximadamente 5,5% nas cinco regiões brasileiras, o que caracteriza  
23 o país como uma área hiperendêmica (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011).

24 Segundo Paula e Costa-Cruz (2011) e relatos do Ministério da Saúde (2005),  
25 os estados de maior ocorrência da estrogiloidíase são Amazonas, Alagoas, Mato  
26 Grosso, São Paulo, Santa Catarina e Minas Gerais. O estado do Paraná, utilizando  
27 técnicas parasitológicas específicas ou não para detecção de *S. stercoralis*, foi  
28 demonstrado que os índices desta parasitose variam de 0,9 de 3,3% na população  
29 em geral (FALAVIGNA et al., 2008; TOLEDO et al., 2009). Dados mais recentes, na  
30 região norte do estado, revelam que *S. stercoralis* foi o mais detectado dentre os  
31 helmintos, pela técnica de Rugai (BOSQUI et al., 2015). Com isso, ressalta-se a

1 importância da utilização de diferentes métodos para que um diagnóstico mais  
2 preciso e, conseqüentemente, o tratamento adequado dos infectados.

3 O governo brasileiro, em 2005, reconhecendo a elevada prevalência da  
4 infecção por *S. stercoralis* no país, incluiu a estrogiloidíase no “Plano Nacional de  
5 Vigilância e Controle das Enteroparasitoses” (BRASIL, 2005) e em 2007, no  
6 Programa de Aceleração do Crescimento (PAC) (MINISTÉRIO DA FAZENDA,  
7 2007), programas que fornecem ações em saneamento básico, objetivando a  
8 melhoria da qualidade de vida da população (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011).

9 Sabe-se que esses níveis estão diretamente relacionados com fatores  
10 ambientais e zoonóticas da população, variações geográficas e riscos para  
11 disseminação e condições relacionadas diretamente com o hospedeiro tais como  
12 imunidade, idade e fatores nutricionais. No entanto, os dados de prevalência são  
13 subestimados uma vez que os métodos de diagnóstico parasitológico utilizados na  
14 rotina laboratorial apresentam baixa sensibilidade e são geralmente, inespecíficos  
15 para detecção desses parasitos, o que limita as informações corretas sobre os  
16 índices epidemiológicos para determinadas regiões, além de, dificultar o  
17 diagnóstico precoce e confirmatório dessas infecções principalmente, a  
18 identificação de larvas de *S. stercoralis* que demandam métodos específicos  
19 baseados no hidrotermotropismo das larvas e habilidade técnica para tal  
20 (HERNANDEZ-CHAVARRIA, 2001; OLSEN et al., 2009; LUVIRA et al., 2016).

21 Em muitas regiões do Brasil, esses dados não são elucidados e a população  
22 continua sem informação (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011). Um levantamento  
23 realizado a partir de 43 estudos, por SCHÄR (2013), sobre a epidemiologia da  
24 estrogiloidíase, mostrou que o Brasil em relação à comunidade infectada (países  
25 que possuíam dados epidemiológicos), representa um número de 11% - 20%,  
26 enquanto que prevalência de *S. stercoralis* em refugiados e imigrantes do país é de  
27 31% - 70%.

28 Os dados elevados de prevalência parasitária, mesmo que subestimados,  
29 reforçam a importância dos mesmos na saúde pública uma vez que as infecções  
30 ocasionadas em decorrência do parasitismo sejam de forma isolada ou quando o  
31 paciente apresenta poliparasitismo ou mesmo outras infecções concomitantes,

1 assume caráter grave especialmente em pacientes com quadro de  
2 imunossupressão onde o diagnóstico incorreto ou tardio, impede o tratamento  
3 adequado e estes, evoluem para o óbito (COSTA et al., 2003; MEJIA; NUTMAN,  
4 2012).

5 A importante relação dos parasitos com os quadros de  
6 imunocomprometimento tem sido demonstrada por diversos autores, Assefa et al.,  
7 (2009) analisando 378 amostras de fezes de pacientes com HIV-AIDS na Etiópia  
8 demonstraram que entre os helmintos, *A. lumbricoides*, nesses pacientes,  
9 apresentou maior positividade (12,4%) seguida de 7,4% de positividade para *S.*  
10 *stercoralis*. Em indivíduos imunocomprometidos a ocorrência da estrogiloidíase no  
11 Brasil no período de 1990 a 2009 foi de 11,8% quando utilizando métodos  
12 parasitológicos e de 19,5% por métodos imunológicos. Os autores relatam que a  
13 ocorrência da infecção aumenta com a idade e está diretamente relacionada com  
14 fatores e condições epidemiológicas da população. No entanto, diversos aspectos  
15 epidemiológicos da estrogiloidíase ainda são desconhecidos principalmente à  
16 associação com outras parasitoses com a presente infecção (PAULA; COSTA-  
17 CRUZ, 2011; LUVIRA et al., 2016).

18 A alta incidência de *S. stercoralis* e principalmente de estrogiloidíase grave  
19 quando não ocorrem o diagnóstico e intervenção terapêutica precoces em  
20 pacientes imunocomprometidos, tem gerado atenção maior para essa parasitose  
21 tanto para a pesquisa como também pela inserção desta em programas de controle  
22 e de vigilância epidemiológica associada ao Ministério da Saúde já que é  
23 considerado um problema de saúde pública, principalmente nos últimos anos  
24 (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011), onde apesar dos avanços científico-tecnológicos  
25 visando melhorias no tratamento e prevenção nesse âmbito, a estrogiloidíase é  
26 considerada ainda uma doença parasitária de grande importância na saúde pública  
27 no Brasil devido à abrangência e endemidade e principalmente, por assumir  
28 caráter grave, por vezes fatal, em indivíduos imunocomprometidos (KASSALIK;  
29 MONDEMULLER, 2011; MEJIA; NUTMAN, 2012; PUTHIYAKUNNON et al., 2014;  
30 LUVIRA et al., 2016).

31

### 1 **1.3. Imunopatogenicidade da estrogiloidíase**

2 Os indivíduos infectados por *S. stercoralis* são assintomáticos em 50% dos  
3 casos, enquanto que os outros podem apresentar desconfortos intestinais. A  
4 presença de ovos, larvas e parasitos adultos na mucosa do intestino delgado  
5 resultam em reação inflamatória, o que pode ocasionar a síndrome de má absorção  
6 e conseqüentemente, diarreia crônica com perda proteica, dor abdominal,  
7 hemorragia com desenvolvimento de quadros de hipoalbuminemia e anemias  
8 (GROVE, 1996; BOULWARE et al., 2007; FARDET et al., 2007).

9 Nos sintomas mais graves, onde a carga parasitária é maior, a enterite é  
10 ulcerativa, resultante de uma inflamação com eosinofilia intensa e infecções  
11 secundárias associadas (pela invasão bacteriana) presentes nas ulcerações que,  
12 durante a evolução, serão substituídas por tecido fibrótico, levando a rigidez da  
13 mucosa intestinal. Observam-se ainda, diarreia persistente, náuseas e vômitos,  
14 síndromes disentéricas esteatorreicas, seguidas de desidratação e ocasionalmente,  
15 pode levar ao choque hipovolêmico, se associado a vômitos, emagrecimento e  
16 acentuado comprometimento do estado geral do doente, muitas vezes fatal  
17 (FERREIRA; COSTA-CRUZ, 2003; TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015;  
18 PAGE; SPEARE, 2016).

19 Os sintomas pulmonares apresentam intensidade variável, estando presentes  
20 em todos os indivíduos infectados, caracterizando-se por tosse com ou sem  
21 expectoração, dispneia, crises asmáticas pela presença das larvas filarioides e  
22 ocasionalmente de fêmeas, podendo atingir a maturidade liberando larvas  
23 rabditoides. A migração e a muda das larvas filarioides podem provocar  
24 rompimento dos capilares dos alvéolos causando hemorragias e infiltrado  
25 inflamatório, constituído de linfócitos e eosinófilos e podem ser limitados ou em  
26 casos mais graves, provocar a Síndrome de Löffler, edema pulmonar e  
27 insuficiência respiratória (PIRES; DREYER, 1993; COSTA-CRUZ, 2005; 2016).

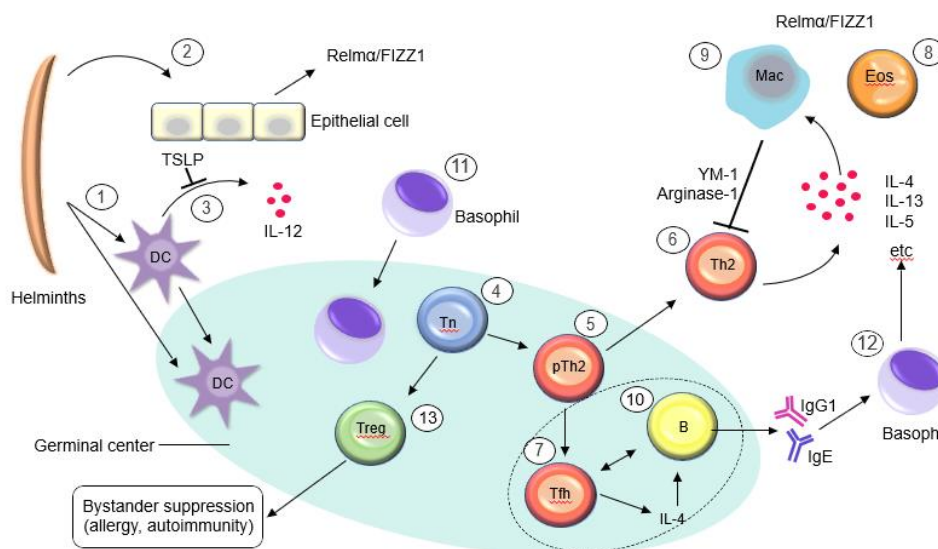
28 As manifestações extra intestinais promovem quadros graves, potencialmente  
29 fatais em indivíduos imunocomprometidos seja pelo quadro de desnutrição,  
30 corticoterapia (acelerando a diferenciação das larvas rabditoides em filarioides),  
31 agentes citostáticos, uso de raios X, leucemias, linfomas, insuficiência renal

1 crônica, neoplasias, diabetes, lúpus eritematoso sistêmico, pela Síndrome da  
2 Imunodeficiência Adquirida (SIDA) ou presença do HIV/HTLV-1 (DEVAULT et al.,  
3 1990; FERREIRA et al., 1999; KEISER; NUTMAN, 2004, MENDONÇA et al. 2006,  
4 MACHADO et al. 2007; GUILLAMET et al., 2017). Esses quadros graves são  
5 capazes de levar a uma hiperinfecção, como consequência da exacerbação do  
6 ciclo de autoinfecção as larvas atingem os pulmões, ou ainda a estrogiloidíase  
7 disseminada, alcançando o organismo como um todo, como o sistema nervoso,  
8 rins e fígado, condições essas que apresentam elevada taxa de mortalidade, por  
9 serem difíceis de serem reconhecidas (DE BONA; BASSO, 2008; PAULA; COSTA-  
10 CRUZ, 2011).

11 A resposta imune do hospedeiro ao *S. stercoralis* é um fator importante no  
12 controle da disseminação da doença, em decorrência da complexidade da  
13 interação parasito-hospedeiro e a capacidade do parasito induzir diferentes formas  
14 clínicas de infecção no homem, porém pouco se sabe sobre quais são os  
15 mecanismos que este parasito utiliza para escapar da resposta imune do  
16 hospedeiro tanto na estrogiloidíase humana quanto em modelos experimentais  
17 (NEGRÃO-CORRÊA, 2001; IRIEMENAM et al., 2010; McDONALD; MOORE,  
18 2017).

19 A figura 2 mostra essa modulação para uma resposta anti-inflamatória com  
20 perfil Th2 ocasionada pelo parasito. Esse tipo de resposta envolve a produção de  
21 citocinas como a linfopoietina estromal tímica (TSLP) produzida na mucosa do  
22 intestino em resposta aos receptores TLR, que são capazes de inibir a produção de  
23 citocinas pró-inflamatórias como a IL-12. As células T reguladoras também são  
24 essenciais para a sobrevivência do parasito, pois permite o estabelecimento da  
25 infecção crônica. Outra célula que participa dessa resposta, porém pouco citada,  
26 são os basófilos, eles são ativados por IgE e possuem a função de secretar IL-4,  
27 que por sua vez é, capaz de ativar os macrófagos alternativos (M2) (MAIZELS  
28 et.al., 2009). Os macrófagos M2, também denominados de alternativamente  
29 ativados, são caracterizados por sua capacidade de secretar citocinas anti-  
30 inflamatórias e imunossupressoras como IL-3, IL-4, IL- 10 e TGF- $\beta$   
31 (GINDERACHTER et al., 2006; REZENDE et al., 2007). Além disso, a polarização

1 para Th3 foi previamente associada à tolerância oral, estimulando a produção de  
 2 IgA, durante infecção crônica por helmintos (WEINER 1997; DOETZE et al., 2000).



3

4 **Figura 2. Interações celulares na resposta imune para helmintos.** Antígenos derivados de  
 5 helmintos podem ser drenados diretamente para os órgãos linfoides secundários, ou interagir com  
 6 células no local da infecção, incluindo células dendríticas (DC) (1) ou células epiteliais (2). Muitos  
 7 antígenos de helmintos são capazes de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias por DCs (3),  
 8 e desencadear a produção de citocinas, tais como linfopietina do estroma do timo (TSLP) de  
 9 células epiteliais, o que inibe a produção de IL-12 por DCs. DCs que transportam antígenos ativam  
 10 as células Th naiva (4), que se proliferam e se diferenciam em células Th2 precursoras (5). As  
 11 células pTh2 podem tornar-se, em seguida, as células Th2 (6) ou células T auxiliares foliculares  
 12 (TFH) (7). As células Th2 liberam várias citocinas, incluindo IL-5, que conduz a eosinofilia (8), e IL-  
 13 4/13, que estimulam macrófagos alternativamente ativados (AAMs) (9). AAM, por sua vez  
 14 produzem moléculas como arginase-1 e YM-1 (proteína expressa em células mieloides de  
 15 camundongos), que minimizam as respostas Th2. Tfh produzem IL-4 e proporcionam ajuda às  
 16 células B para a produção de IgG1 e IgE (10). Durante a resposta precoce de infecções helmínticas,  
 17 MHC de classe II que são expressas em basófilos (11) introduzidas nos órgãos linfoides  
 18 secundários, podem ajudar a polarizar a resposta Th2. IgE pode ativar basófilos (12), que por sua  
 19 vez produzem citocinas que ativam macrófagos alternativos. As infecções por helmintos, também  
 20 podem promover o desenvolvimento da resposta de células T reguladoras (13) (Adaptado de  
 21 MAIZELS et al., 2009).

22

23 No homem, tanto a infecção na forma assintomática como na sintomática com  
 24 a presença de sintomas leves, tem sido demonstrado aumento nos níveis de  
 25 anticorpos das classes IgA, IgM, IgG, IgG1, IgG4 e IgE específicos (GENTA, 1989;  
 26 ATKINS et al., 1997; HIRATA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007; BOSQUI et  
 27 al., 2015). A hipersensibilidade mediada pela IgE antígeno específica é a mais  
 28 rápida resposta imune efetora contra os parasitos e inicia-se quando os mastócitos  
 29 já sensibilizados, liberam os mediadores pré-formados estocados em grânulos

1 intracitoplasmáticos que incluem a histamina, heparina, proteases e fatores  
2 quimiotáticos para eosinófilos e neutrófilos (GALIOTO et al., 2006).

3 A eosinofilia é causa comum nas infecções parasitárias, principalmente nas  
4 infecções por helmintos que invadem os tecidos durante a fase larvária do  
5 desenvolvimento. Entre os nematóides intestinais, ancilostomídeos e *Strongyloides*  
6 são os que apresentam eosinofilia mais elevada (MEEUSEN; BALIC, 2000). Os  
7 eosinófilos são capazes de eliminar os parasitos através da liberação de  
8 substâncias como proteínas tóxicas, bem como radicais livres, que podem destruir  
9 o parasito, mas também produzem lesões teciduais nas reações alérgicas (ORTIZ  
10 et al., 2000). Os eosinófilos produzem algumas moléculas como as  
11 prostaglandinas, leucotrienos e citocinas, que amplificam a resposta imune  
12 inflamatória, recrutam e ativam mais eosinófilos e outros leucócitos. Essas  
13 moléculas agem na superfície do parasito, e através da citotoxicidade celular  
14 dependente de anticorpo, facilitando o processo de desgranulação (KEREPESI et  
15 al., 2007).

16 A autoinfecção e a contínua migração da larva filarioide pelos tecidos resultam  
17 em incessante exposição sistêmica aos antígenos parasitários, acarretando o  
18 aumento da resposta promovida por IgG4 que modula as reações alérgicas  
19 mediadas por IgE por meio da competição ou inibição de sua ligação às células,  
20 principalmente mastócitos (MAcDONALD et al., 2002; COSTA-CRUZ, 2005; 2016).  
21 Assim, a estrogiloidíase crônica pode ser resultado da diminuição das respostas  
22 de hipersensibilidade (IgE mediadas) para a persistente autoinfecção, com  
23 consequente redução dos efeitos imunopatológicos da anafilaxia constante  
24 (ATKINS et al., 1997). No entanto, nos casos de doença disseminada e de  
25 imunossupressão, os níveis de IgE podem estar normais (MARCOS et al., 2008).

26 As subclasses de IgG podem exercer efeitos diferentes sobre a resposta  
27 alérgica. Os níveis basais de IgG1, são preditivos para uma resposta mais tardia  
28 após uma estimulação com um alérgeno. Diferentemente da subclasse IgG4 a qual  
29 tem se atribuído uma atividade protetora, atuando como um fator inibitório da  
30 reação de hipersensibilidade mediada por IgE (MORI et al., 2001). Os anticorpos  
31 IgG são os mais frequentes detectados no soro, pois permanecem por um longo

1 tempo, após a cura terapêutica. (COSTA-CRUZ, 2011; LEVENHAGEN; COSTA-  
2 CRUZ, 2014).

3 A descrição da Imunoglobulina A (IgA) sérica e suas propriedades por  
4 Heremans; Heremans e Schultze (1959), foi o ponto inicial para estudos de vários  
5 autores nas respostas desse anticorpo às parasitoses (BRANDTZEG, 1973;  
6 DELACROIX et al., 1982; MESTECKY; McGHEE, 1987; CONLEY; DELACROIX,  
7 1987). IgA sérica representa 10% a 15% do total de imunoglobulinas circulantes. A  
8 maioria das IgA sérica circulante (80-90%) é produzida na medula óssea e  
9 pertence à subclasse de IgA1, enquanto no trato intestinal predomina a subclasse  
10 dimérica IgA2 sintetizada principalmente em sítios da mucosa. A vida média da IgA  
11 sérica é de três a seis dias. Em relação ao catabolismo da imunoglobulina A, é  
12 relativamente rápido comparado à IgG, e isso pode resultar em baixos níveis  
13 séricos de IgA (WOOF; KERR, 2006; KADAOUI; CORTHESEY, 2007; BENCKERT  
14 et al., 2011).

15 A IgA exibe quatro propriedades que facilitam a sua função nas superfícies  
16 das mucosas. A polimerização e a interação com o componente secretor (SC), uma  
17 proteína produzida pelas células epiteliais que atua como receptor de transporte  
18 para IgA e torna-se parte integrante da molécula IgA secretada (SANDERSON;  
19 WALKER, 1999). Uma vez que a IgA tenha sido segregada pelas células  
20 plasmáticas da mucosa, ela se liga ao receptor de imunoglobulina polimérica  
21 (pIgR), o qual irá transportá-la para o interior de vesículas através de células  
22 epiteliais do intestino delgado, para a superfície luminal, onde o receptor é liberado  
23 por clivagem proteolítica do pIgR, deixando uma quantidade do fragmento da  
24 proteína de transporte (chamado componente secretor) ligado e outra parte livre  
25 (Figura 3) (BRANDTZAEK, 1973; BRANDTZAEK, 1974; BLAISE, 2013). A IgA é  
26 dimerizada por um componente J, que liga as cadeias pesadas de duas moléculas  
27 de IgA. O transporte de IgA tem função útil, podendo ser disseminada através da  
28 mucosa intestinal, permitindo a migração para diferentes tecidos linfóides  
29 associados a mucosas (BRANDTZAEK, 2003).

30 Outra propriedade trata-se da resistência à proteólise, a interação da  
31 molécula IgA com o CS para formar IgA secretora, torna a molécula menos

1 susceptível à digestão proteolítica no ambiente intestinal rico em proteinase. Além  
2 disso, podem apresentar propriedades anti-inflamatórias, bem como inflamatórias.  
3 As propriedades anti-inflamatórias consistem na porção Fc da IgA, que  
4 diferentemente de IgM ou IgG, não reage com componentes da via clássica ou da  
5 via alternativa do complemento, exceto, possivelmente, quando IgA está altamente  
6 polarizada ou encontra-se na forma de imunocomplexo, mesmo assim, ela não se  
7 liga ao C3b, portanto, não recruta células inflamatórias nem mediadores. A ligação  
8 de IgA a neutrófilos e outras células fagocíticas através do domínio Fc resulta em  
9 inibição das funções fagocíticas e líticas dessas células. O conjunto Fc/CS da IgA  
10 interfere na fixação de microrganismos às células epiteliais, aprisionando-os na  
11 camada de muco, impedindo assim, a colonização dos patógenos sem induzir  
12 inflamação. Em contrapartida, IgA pode e tem capacidade de mediar efeitos  
13 inflamatórios em determinadas circunstâncias, como é o caso do contato com  
14 partículas recobertas por IgA, levando à opsonização e ativação fagocítica através  
15 do receptor Fc (MESTECKY; MCGHEE, 1987; SANDERSON; WALKER, 1999; DE  
16 CARVALHO et al., 2013).

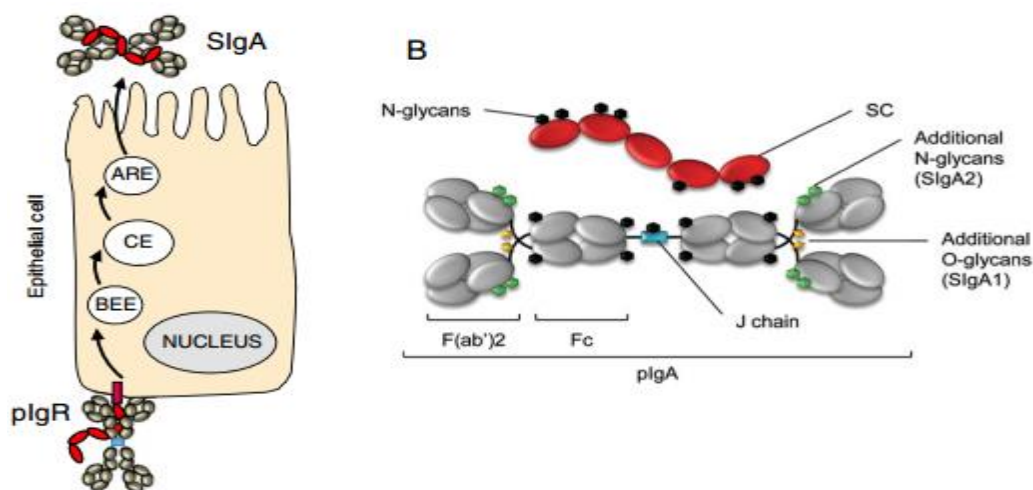
17 A Imunoglobulina A dimérica é o segundo anticorpo mais presente no soro e  
18 representa a classe mais proeminente nas mucosas e suas secreções, podendo  
19 estar presente no leite materno, suor, lágrimas, fluido cefalorraquidiano, suco gástrico,  
20 muco e líquido peritoneal (BENCKERT et al., 2011). O fato do ciclo biológico de *S.*  
21 *stercoralis* apresentar o envolvimento de mucosas pulmonar e intestinal, possibilita  
22 ao hospedeiro elaborar resposta local e sistêmica mediada por IgA (ATKINS et al.,  
23 1999; GONÇALVES et al., 2012a).

24 A descoberta de que, a IgA é a classe predominante nas secreções  
25 intestinais, contribuiu para avanços no campo da imunologia de mucosa, isso pode  
26 ser explicado devido a maior quantidade de linfócitos B ativados, cerca de 80%,  
27 estarem presentes na mucosa intestinal, tornando o intestino o maior órgão  
28 produtor de anticorpos no organismo (CHODIRKER; TOMASI, 1963; BENCKERT  
29 et al., 2011).

30 Além da IgA, outras imunoglobulinas podem ser produzidas na mucosa,  
31 como é o caso da IgM, que também pode ser transportada através das células

1 epiteliais pelo mecanismo do CS, em geral, serve como substituto adequado da IgA  
 2 em indivíduos com deficiência seletiva de IgA. Por outro lado, a síntese de IgG é  
 3 muito baixa na maioria das áreas da mucosa, e esta imunoglobulina não pode ser  
 4 transportada através do epitélio. A IgE também pode ser sintetizada nos tecidos da  
 5 mucosa, particularmente durante infecções parasitárias ou em certos estados  
 6 alérgicos, entretanto, as células B produtoras de IgE não se localizam  
 7 preferencialmente na mucosa, e a proporção de células B presentes na mucosa  
 8 que sintetizam IgE é pequena (McINTYRE; STROBER, 1999).

9 Diante disso, IgA secretória é dentre as imunoglobulinas, a mais presente na  
 10 mucosa do trato respiratório saudável, além de ser importante na defesa intestinal,  
 11 sendo capaz de promover fagocitose, através da ligação nos receptores expressos  
 12 na superfície de eosinófilos, neutrófilos e monócitos/macrófagos, neutraliza vírus  
 13 em células epiteliais e ativa a via alternativa do sistema complemento (Figura 3)  
 14 (MONTEIRO; VAN DE WINKEL, 2003; BLAISE, 2013).



15  
 16 **Figura 3.** Secreção e componentes da IgA: (A) Caminho que conduz à liberação de IgA secretora  
 17 (SIgA) nas secreções de mucosas. (B) Componentes da IgA: cadeias leves e pesadas, componente  
 18 J, componente secretor (BLAISE, 2013).

19 Anticorpos IgA específicos para *Strongyloides* foram previamente detectados  
 20 em amostras de soro e principalmente nos fluídos de mucosa, como leite materno e  
 21 saliva, utilizando preparações de larvas homólogas ou heterólogas em  
 22 imunoenaios (ATKINS et al., 1999; GONZAGA et al., 2011; MOTA-FERREIRA et  
 23 al., 2009; RIBEIRO et al., 2010).

1           As células B produtoras de IgA são capazes de estabelecer residência no  
2 tecido mamário em lactação após a secreção de determinados hormônios  
3 gestacionais. A concentração de IgA nas secreções mamárias iniciais (colostró) é  
4 extremamente alta, podendo ultrapassar a quantidade de 50 mg/mL, além da IgA  
5 outros componentes solúveis em seu conjunto atuam na defesa do hospedeiro no  
6 intestino do recém-nascido (BUTLER, 1999).

7           Estudos realizados em grupos de crianças com diferentes estágios de  
8 desnutrição demonstraram que a deficiência nutricional em crianças infectadas com  
9 *A. lumbricoides* e *T. trichiura* podem interferir e estar diretamente relacionado com  
10 as baixas concentrações de IgA secretora. À medida que aumenta a intensidade da  
11 carga parasitária e a desnutrição, os resultados demonstram que há uma  
12 diminuição de IgA secretora com aumento de IgE total, sugerindo que a  
13 desnutrição altera o mecanismo de defesa da IgA nas mucosas contra esses  
14 helmintos e compromete a barreira intestinal contra a invasão de patógenos (Elia  
15 In: ELIA, C.C.S, 2001).

16           Guimarães e Sogayar (2002) avaliaram anticorpos séricos anti-*Giardia*  
17 *lamblia* em crianças em áreas endêmicas, onde 68% dessas crianças  
18 apresentaram anticorpos anti-*G. lamblia*, salientando a importância da avaliação  
19 imunológica principalmente em habitantes de áreas contaminadas.

20           Rodrigues e col. (2009) demonstraram que as moléculas MHC de classe II  
21 são essenciais para a imunidade protetora, induzindo a produção de anticorpos  
22 como IgA nas mucosas, e levando ao mecanismo de eliminação de *S.*  
23 *venezuelensis* em murinos. Esses resultados evidenciam o importante papel da IgA  
24 em casos de estrogiloidíase, tornando-a uma ferramenta importante no  
25 imunodiagnóstico.

26           O papel da resposta humoral na estrogiloidíase crônica, na detecção de  
27 diferentes imunoglobulinas aos antígenos de larvas filarioides de *S. stercoralis*, foi  
28 examinado em ex-prisioneiros de guerra, infectados cronicamente há 30 anos.  
29 Assim, foi postulado que a respostas mediadas por IgA, inibem a fecundidade do  
30 verme e a viabilidades dos ovos na estrogiloidíase humana, enquanto as  
31 respostas mediadas por IgE estão envolvidas na regulação da autoinfecção das

1 larvas e que IgG4 bloqueia respostas alérgicas mediadas por IgE (ATKINS et.al,  
2 1999; COSTA-CRUZ, 2016).

3 IgA produzidas localmente nas mucosas são importantes na defesa contra *S.*  
4 *stercoralis*. A deficiência de IgA pode ter implicações clínicas em termos de uma  
5 lenta recuperação incompleta e infecção disseminada causada pelo helminto  
6 (WENMAN, 1987; SINGH et al., 2014). Além de promover o entendimento da  
7 resposta imune humoral desencadeada por *S. stercoralis*, a pesquisa de anticorpos  
8 principalmente das classes IgM, IgA e IgG, é importante também para o diagnóstico  
9 complementar da estrogiloidíase (COSTA-CRUZ, 2016).

10

#### 11 **1.4. Diagnóstico da estrogiloidíase**

12

##### 13 **1.4.1. Diagnóstico parasitológico**

14 O diagnóstico da estrogiloidíase é confirmado pelo encontro das formas  
15 parasitárias de *S. stercoralis*. As larvas são usualmente visualizadas nas fezes,  
16 podendo ser vistas no fluído duodenal e ocasionalmente, em outros tecidos ou  
17 fluídos de pessoas infectadas. No entanto, na grande maioria dos indivíduos, o  
18 parasito é encontrado em número reduzido, devido à baixa e irregular eliminação  
19 das larvas nas fezes. Desta forma as técnicas de rotina para o exame  
20 coproparasitológico como Hoffmann, Pons e Janer (1934), Ritchie (1948) e Faust  
21 (1939), não são adequados para a detecção do mesmo. Os métodos  
22 parasitológicos de Baermann (1917), modificado por Moraes (1948) e de Rugai,  
23 Mattos e Brisola (1954) são indicados, pois se baseiam no hidro e termotropismo  
24 das larvas. Ainda assim, são necessárias várias amostras de fezes colhidas em  
25 dias alternados (SIDDIQUI; BERK, 2001; FELICIANO et al., 2010).

26 São descritos também os métodos de cultura, utilizados com a finalidade de  
27 diferenciar as larvas e tornar possível sua identificação, embora seja tecnicamente  
28 difícil pelo risco de infecção durante a manipulação das larvas infectantes e pela  
29 demora na obtenção dos resultados (KOGA et al., 1991; STEINMANN, 2007; INÊS  
30 et al., 2013).

1 Em pacientes com estrogiloidíase grave, o exame da secreção do lavado  
2 brônquico ou biópsia da pele pode ser o método diagnóstico mais provável, porém  
3 na maioria das vezes o diagnóstico é realizado *post-mortem* (LEUNG; LIEW;  
4 SUNG, 1997). Há relatos de estrogiloidíase severa confirmada por métodos não  
5 usuais de diagnóstico, como biópsia do sistema digestório, exame do fluido  
6 alveolar, análise da secreção respiratória por microscopia fluorescente, sangue  
7 periférico e fluido cerebrospinal (ONUIGBO; IBEACHUM, 1991; TAKAYANAGUI  
8 et al., 1995; NOMURA; REKRUT, 1996; DOORN et al., 2007).

9 O hemograma permite a visualização das variações hematológicas que  
10 ocorrem nas doenças parasitárias, como anemia e eosinofilia. Os eosinófilos  
11 compreendem 2 a 4% dos leucócitos em indivíduos não alérgicos, observa-se um  
12 aumento na taxa de eosinófilos de até 82% na fase aguda da doença, no entanto  
13 diminui na fase crônica 8 a 15%, desaparecendo nos casos de evolução grave ou  
14 fatal (TRAJMAN; MacDONALD; ELIA, 1997; ONAH; NAWA, 2000; LOUFTY et al.,  
15 2002; BOULWARE et al., 2007).

#### 17 **1.4.2. Diagnóstico imunológico**

18  
19 Testes imunológicos têm sido úteis na avaliação da resposta imune do  
20 hospedeiro, nos casos de formas assintomáticas com a finalidade de  
21 esclarecimento do diagnóstico clínico, e em inquéritos soro epidemiológicos por  
22 apresentarem elevada sensibilidade em relação aos métodos parasitológicos  
23 (FOGAÇA et al., 1990; LINDO et al., 1996; SUDRÉ et al., 2006; COSTA-CRUZ,  
24 2005; 2016). O teste imunológico mais usado, por apresentar elevada sensibilidade  
25 e especificidade, é o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) para pesquisa  
26 de anticorpos específicos do parasito, usando como antígeno o extrato salino e  
27 alcalino de larvas filarioides, homólogas ou heterólogas (GENTA, 1988; CONWAY  
28 et al., 1993; LINDO et al., 1996; SATO; KOBAYASHI; SHIROMA, 1995; SCHAFFEL  
29 et al., 2001, MERCADO et al., 2002; YORI et al., 2006; DOORN et al., 2007;  
30 RODRIGUES et al., 2007).

1 Com o intuito de auxiliar no diagnóstico precoce da estrogiloidíase, e devido  
2 a dificuldade na obtenção de antígenos homólogos de *S. stercoralis*, estudos são  
3 realizados utilizando o extrato antigênico heterólogo no imunodiagnóstico da  
4 estrogiloidíase humana, como por exemplo, o emprego do extrato alcalino de  
5 larva *S. venezuelensis*, visto que, Machado e colaboradores (2003) afirmaram que  
6 se trata de um extrato com alta sensibilidade e especificidade na detecção de IgG  
7 específica em soro humano através do teste de ELISA. Bosqui e colaboradores  
8 (2015; 2018) também utilizando extrato alcalino, demonstraram a eficiência na  
9 detecção de anticorpos IgG, IgA e imunocomplexos IgG em amostras pareadas de  
10 soro e saliva. Gonçalves e colaboradores (2012b) demonstraram que extratos  
11 alcalinos produzidos a partir de fêmeas partenogênicas, parasitas e ovos de *S.*  
12 *venezuelensis* podem ser utilizados como ferramenta alternativa no  
13 imunodiagnóstico, embora o melhor extrato antigênico continue sendo o extrato  
14 produzido a partir de larvas filarioides.

15 Feliciano e colaboradores (2010), comprovaram que purificando o extrato  
16 bruto de *S. venezuelensis* com triton X-114, a fração detergente do extrato salino  
17 demonstrou alta especificidade, indicando fonte de peptídeos específicos para o  
18 diagnóstico sorológico humano. Ribeiro e colaboradores (2010) utilizando extrato  
19 salino total de *S. venezuelensis* e fase detergente, relataram pela primeira vez, a  
20 detecção de anticorpos IgA e IgG em amostras pareadas de soro e saliva na  
21 estrogiloidíase humana, onde a fase detergente se mostrou mais eficiente,  
22 podendo ser uma alternativa na detecção de antígenos nessas amostras.

23 A reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) também pode ser realizada  
24 utilizando antígenos de larvas filarioides para detecção de diferentes classes de  
25 imunoglobulinas, tanto no soro quanto na saliva (GROVE; BLAIR, 1981; ROSSI et  
26 al., 1993; COSTA-CRUZ et al., 1997; MACHADO et al., 2007; COSTA et al., 2003,  
27 BOSCOLO et al. 2007).

28 A técnica Dot-ELISA é amplamente aceita como um teste rápido e versátil  
29 para a detecção de diferentes doenças parasitárias (PAPAS, 1988; SANTOS et al.,  
30 2000; SAMPAIO et al., 2015). Além disso, técnica é fácil de executar e interpretar,  
31 utiliza reagente conservativo que é eficiente e portátil no campo e pode ser usado

1 para testes de grande volume ou para um pequeno número de determinações  
2 (BLANCO et al., 2009).

3 Outro teste utilizado para o diagnóstico da estrogiloidíase é *Western blotting*  
4 ou *Immunoblotting* por ser uma técnica altamente sensível e específica no  
5 reconhecimento de frações proteicas da larva filarioide de *S. stercoralis* ou  
6 heterólogas (SATO, 1990; ATKINS et al., 1999; UPARANUKRAW; PHONGSRI;  
7 MARAKOTE, 1999; SILVA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2004, SUDRÉ et al.,  
8 2007).

9 Diante desses dados, observamos avanços nas pesquisas envolvendo  
10 anticorpos no diagnóstico da estrogiloidíase utilizando extratos heterólogos e  
11 também amostras biológicas diversificadas como, por exemplo, a saliva, podendo  
12 estes, serem complementados por testes mais sensíveis com o auxílio da biologia  
13 molecular como ferramenta diagnóstica.

14

#### 15 **1.4.3. Utilização da saliva como ferramenta alternativa no diagnóstico da** 16 **estrogiloidíase**

17

18 Nos últimos anos, houve aumento gradativo no número de pesquisas  
19 utilizando anticorpos salivares específicos em doenças infecciosas, bem como para  
20 pesquisa de biomarcadores na epidemiologia e toxicologia (RIBEIRO et al., 2010;  
21 BOSQUI et al., 2015; 2017). A quantificação de anticorpos em amostras de saliva  
22 tem sido realizada para diferentes protozoários (LOYOLA et al., 1997; PINHO et al.,  
23 1999) e helmintos (BUENO et al., 2000; COSTA et al., 2003; Costa-Cruz: IN  
24 NEVES et al., 2005; RIBEIRO et al., 2010; SHARIATI et al., 2010; BOSQUI et al.,  
25 2015).

26 A saliva é caracterizada por uma secreção basal contínua, podendo chegar  
27 a um volume total de um a dois litros por dia em um homem adulto, e tem por  
28 função umedecer e proteger a mucosa oral, além de aumentar a demanda sobre as  
29 glândulas salivares principalmente durante a alimentação. Essas variações de fluxo  
30 envolvem não só o volume da saliva, como também os seus constituintes orgânicos  
31 e inorgânicos. Além de conter ar, que lhe dá o aspecto espumoso, a saliva tem

1 como principais componentes químicos a água, amilase salivar, nitrogênio, enxofre,  
2 potássio, sódio, cloro, cálcio, magnésio, ácido úrico e ácido cítrico (KAUFMAN;  
3 IRA; LAMSTER, 2002). Além disso, a saliva possui na sua composição proteínas  
4 estruturais como mucinas, estaterina, aglutininas, lactoferrina, gustina e sialina que  
5 são capazes de auxiliar na formação de corpúsculos gustativos e aumentar o pH, e  
6 as proteínas enzimáticas como amilase, fosfatase ácida, esterase, lisozima,  
7 peroxidase, anidrase carbônica e calicreína que atuam principalmente na secreção  
8 salivar, bem como os componentes imunológicas tais como imunoglobulinas e  
9 imunoglobulinas secretoras (sIgA/sIgM) (KAUFMAN; IRA; LAMSTER, 2002;  
10 MAMTA et al., 2013).

11 A elevada quantidade de IgA (3g/dia) em seres humanos pode ser explicada  
12 pela necessidade de uma resposta imunológica presente nas superfícies de  
13 mucosa, por onde a maioria dos patógenos adentram o organismo, sendo exposto  
14 a um enorme desafio antigênico (WHITMAN et al., 1998). As glândulas  
15 submandibulares contêm o dobro de IgA quando comparado com a glândula  
16 parótida, devido a sua exposição primária ao patógeno, e cerca de 77% de IgA  
17 monomérica presente na saliva é derivada do soro e não de células plasmáticas  
18 glandulares. Já maioria das imunoglobulinas IgG presente na saliva, advém da  
19 circulação sanguínea por difusão passiva, principalmente através do epitélio  
20 gengival, embora uma pequena quantidade possa ser produzida localmente pelas  
21 glândulas salivares (BRANDTZAEG, 2013).

22 Alguns indivíduos apresentam o fluxo salivar reduzido, levando a um quadro  
23 de xerostomia, sintoma relacionado à falta de saliva. A xerostomia pode ocorrer por  
24 conta de medicamentos como a atropina, medicamentos anorexígenos,  
25 radioterapia da cabeça e pescoço, deficiência de vitaminas do complexo B,  
26 pacientes diabéticos, menopausa, ansiedade, álcool e a cafeína, e nos idosos a  
27 saliva é mais viscosa e em menor quantidade, causando-lhes uma halitose  
28 característica (PALAMIN, 1999).

29 As vantagens das pesquisas realizadas em amostras de saliva são maior  
30 aceitabilidade, pois trata-se de coletas não invasivas e sem dor, maior proveito  
31 (baixo custo e colheita rápida) e oferece menor risco de contaminação ao

1 manipulador (SMITH; BOWEN, 2000; SANCHEZ-MARTIN et al., 2001; COSTA et  
2 al., 2003; RIBEIRO et al., 2010; BOSQUI et al., 2015).

#### 3 4 **1.4.4. Diagnóstico molecular**

5  
6 A biologia molecular também pode ser uma ferramenta diagnóstica indicada  
7 na estrogiloidíase, para tal tem-se o antígeno recombinante de larva filarioide  
8 purificado em reação imunoenzimática (RAVI et al., 2002) e a partir disso, foi  
9 padronizado a reação em cadeia da polimerase convencional (cPCR) e cadeia de  
10 polimerase em tempo real (qPCR) para detecção de DNA de *S. stercoralis* em  
11 material fecal humano (VERWEIJ et al., 2009; KRAMME et al., 2011).

12 O diagnóstico baseado em qPCR tem sido aplicado com mais frequência,  
13 demonstrando alta sensibilidade e especificidade, sendo de extrema importância na  
14 redução do tempo de detecção de anticorpos e também aumentar o sucesso da  
15 detecção de DNA dos parasitos (GOMEZ-JUNYENT et al., 2016).

16 As técnicas de isolamento de DNA de amostras fecais frescas são viáveis,  
17 realistas e aplicáveis na maioria dos países endêmicos e são cada vez mais  
18 usadas para o diagnóstico de infecções parasitárias, pois adicionam alta  
19 sensibilidade e especificidade (MARRA et al., 2010; VERWEIJ; STENSVOLD,  
20 2014; REPETTO et al., 2016).

21 Como a detecção de DNA torna-se cada vez mais utilizada para o diagnóstico  
22 de infecções por parasitas, este método tem potencial para ultrapassar os  
23 problemas enfrentados no diagnóstico da estrogiloidíase humana (ten HOVE et  
24 al., 2009). Apesar de ainda não ter sido descrita uma sequência ideal para o  
25 diagnóstico molecular da estrogiloidíase, diversos trabalhos estão sendo  
26 realizados para se determinar sequências de genes desse parasito (PUTLAND et  
27 al., 1993; DORRIS; BLAXTER, 2000; MARCILLA et al., 2012). A literatura descreve  
28 os primers espécie-específica e gênero como marcadores importantes para o  
29 diagnóstico molecular da estrogiloidíase (REPETTO et al., 2016; BOSQUI et al.,  
30 2018; PAULA et al., 2018) e estes podem ser utilizados como ferramentas

1 alternativas para o rastreamento de *S. stercoralis* em amostras de fezes humanas,  
2 especialmente em áreas tropicais.

3 A detecção do DNA do parasito em amostras fecais através da amplificação  
4 por reação de polimerase em cadeia tem-se mostrado um método diagnóstico  
5 sensível e específico para detecção de *S. stercoralis* (VERWEIJ et al., 2009;  
6 KRAMME et al., 2011; SITTA et al., 2014, BOSQUI et al., 2018; PAULA et al.,  
7 2018). Técnicas como PCR multiplex ou nested-PCR, utilizando regiões do DNA  
8 ribossomal, também apresentaram resultados satisfatórios para detecção deste  
9 helminto em amostras fecais (NILFOROUSHAN et al., 2007; ten HOVE et al., 2009;  
10 BASUNI et al., 2011). Atualmente, a qPCR é o método molecular mais explorado,  
11 devido à sua maior sensibilidade em relação ao cPCR (sensibilidade de 76,7%;  
12 especificidade de 84,3%) (PAULA et al., 2015), contudo, apresentam maiores  
13 custos com padrões. Sharifdini e colaboradores (2015) encontraram maior  
14 sensibilidade para nested-PCR (sensibilidade de 100%, especificidade de 91,6%)  
15 em comparação com qPCR (sensibilidade de 84,7%, especificidade de 95,8%), o  
16 qual pode ser uma alternativa possível e com menor custo.

17 A otimização do diagnóstico de *S. stercoralis* é uma etapa crucial na luta  
18 contra a estrogiloidíase humana. Os laboratórios de diagnósticos vêm cada vez  
19 mais inovando com o uso de técnicas moleculares, visando aumentar a eficiência e  
20 a velocidade dos resultados, uma vez que, as vantagens da técnica de PCR sobre  
21 a sorologia incluem alta especificidade e redução da reatividade cruzada com  
22 outros patógenos nas fezes (BUONFRATE et al., 2015; DONG et al., 2016).

23 Os testes parasitológicos específicos para a detecção de *S. stercoralis*, não  
24 apresentam a sensibilidade adequada e dependem também de variáveis como  
25 capacidade técnica, utilização correta dos métodos de detecção, tempo de  
26 realização entre outros fatores, para que resultados falso-negativos sejam evitados.  
27 Nesse sentido, a utilização de testes mais sensíveis e específicos como os  
28 moleculares aplicados em fezes frescas e imunológicos utilizando amostras  
29 convencionais como o soro, e alternativas como a saliva, contribuem efetivamente  
30 no diagnóstico da estrogiloidíase além de ser considerada ferramenta importante  
31 principalmente em casos onde a confirmação precoce se faz necessária.

## 1 1.5. Etiopatogenia da tuberculose e seus desafios

2 A tuberculose é uma doença infectocontagiosa causada por uma bactéria  
3 intracelular que afeta principalmente os pulmões (FOCHESATTO; BARROS, 2013).

4 As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, família  
5 *Mycobacteriaceae*, sub-ordem *Corynebacteriaceae*, ordem *Actinomycetales*. No  
6 humano a forma mais comum de infecção ocorre por *Mycobacterium tuberculosis*  
7 ou Bacilo de Koch (BK). Outras espécies de micobactérias também podem causar  
8 a tuberculose. São elas: *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti* (PROBST et al., 2011).

9 *Mycobacterium tuberculosis* é um bacilo reto ou ligeiramente curvo, imóvel,  
10 não esporulado, não encapsulado, que mede de 1 a 10 µm de comprimento por 0,2  
11 a 0,6 µm de largura, sendo a propriedade morfotintorial do álcool-ácido resistência  
12 a mais importante. Sua parede é constituída principalmente por ácidos micólicos,  
13 formando uma barreira hidrofóbica que confere resistência à dessecação, à  
14 descoloração por álcool e ácido e a ação de diversos agentes químicos e  
15 antibióticos. Dificilmente podem ser corados pelo método de Gram, mas são  
16 considerados como Gram positivos pelas características da sua parede celular.  
17 Também apresentam um alto conteúdo lipídico em sua parede celular, responsável  
18 por importantes efeitos biológicos, como a indução da formação de granuloma  
19 (CAMPOS, 2006).

20 A transmissão da tuberculose é direta, de pessoa a pessoa, sendo, portanto,  
21 a aglomeração de pessoas o principal fator de transmissão. Má alimentação, falta  
22 de higiene, tabagismo, alcoolismo ou qualquer outro fator que gere baixa  
23 resistência orgânica, também favorece o estabelecimento da tuberculose (MELO et  
24 al., 2009).

25 Alguns pacientes não exibem nenhum indício da tuberculose, outros  
26 apresentam sintomas semelhantes ao de uma gripe. Tosse seca e contínua se  
27 apresentando posteriormente com secreção e com duração de mais de quatro  
28 semanas, sudorese noturna, cansaço excessivo, palidez, falta de apetite e  
29 rouquidão são os sintomas da doença. Dificuldade na respiração, eliminação de  
30 sangue e acúmulo de pus na pleura pulmonar são característicos em casos mais  
31 graves (SILVA et al., 2011), onde a resposta imune tem papel fundamental na

1 defesa, constituindo o principal impedimento para a ocorrência das infecções  
2 disseminadas, infecções essas, associadas ao elevado índice de mortalidade  
3 (MACHADO et al., 2004).

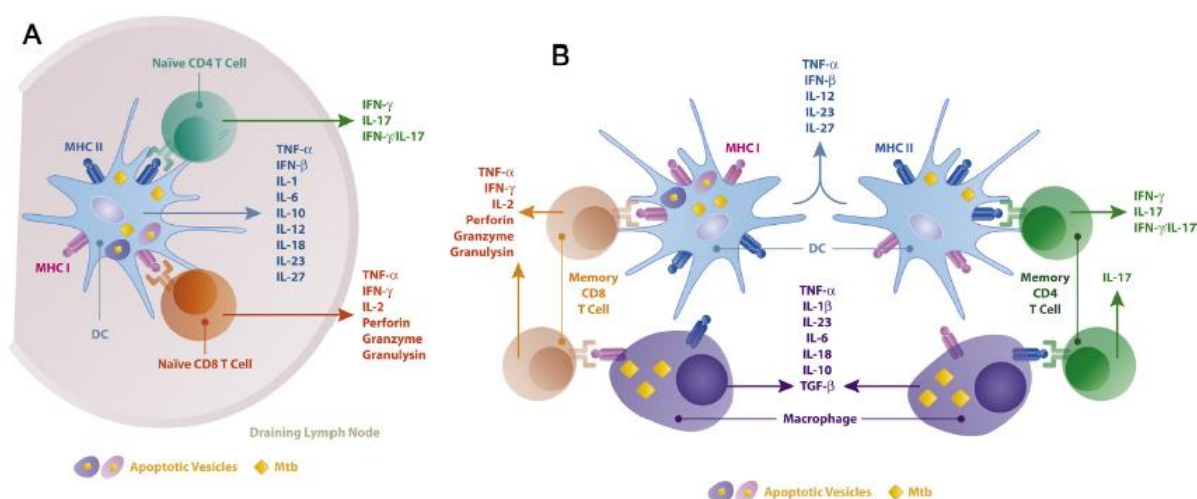
4 A característica principal de *M. tuberculosis* é a capacidade de sobreviver  
5 dentro dos macrófagos. Após a fagocitose dos bacilos, inicia-se, dentro do  
6 citoplasma do macrófago, um mecanismo de fusão do fagossoma contendo o BK  
7 com um lisossoma repleto de substâncias lesivas visando à destruição do bacilo. O  
8 fagolisossoma formado fica ligado ao bacilo por meio de receptores de  
9 complemento e do receptor de manose, principalmente (Fig. 4). Já dentro do  
10 fagolisossoma, o ambiente se torna hostil para o BK, que sofre a ação do pH ácido  
11 e de intermediários reativos de oxigênio (ROIs) e de nitrogênio (RNIs), de enzimas  
12 lisossômicas, de peptídeos tóxicos e do interferon-gama (IFN- $\gamma$ ). Aparentemente,  
13 os RNIs são as armas mais potentes do macrófago contra as micobactérias  
14 virulentas. Por outro lado, o BK é dotado de mecanismos para sobreviver à fusão  
15 dos fagolisossomas. A glicoproteína lipoarabinomanana (LAM) presente na  
16 superfície do bacilo inibe a ação de compostos intermediários de formas reativas  
17 do oxigênio e diminui a produção de citocinas inflamatórias. Outra estratégia  
18 utilizada pelo bacilo inclui inibição do processo de fusão, inativação das enzimas  
19 lisossômicas, modificações no fagolisossoma que facilitam a sobrevivência e  
20 replicação do bacilo e a fuga para o citoplasma do macrófago (CAMPOS, 2006).

21 Dentro dos macrófagos essas bactérias podem estimular tanto as células  
22 TCD4<sup>+</sup> através da expressão de antígeno associado ao MHC classe II, como  
23 também células TCD8<sup>+</sup> através da expressão de antígenos associados a moléculas  
24 do MHC classe I. A ativação de células TCD4<sup>+</sup> leva à secreção de IFN- $\gamma$ , que ativa  
25 mais macrófagos levando à produção aumentada de óxido nítrico (NO) e destruição  
26 da bactéria. As células TCD8<sup>+</sup> participam do mecanismo de defesa através da  
27 citotoxicidade, destruindo os macrófagos infectados (ABBAS, 2008). Com a  
28 chegada dos linfócitos T ao local da infecção, tem início a lesão granulomatosa  
29 característica da tuberculose. O granuloma é formado por células gigantes,  
30 derivadas dos macrófagos e por linfócitos T, que tentam conter a disseminação do  
31 BK. No centro do granuloma, observam-se células epitelióides e células gigantes

1 de langerhans e, em seu envoltório, linfócitos TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Com o  
 2 desenvolvimento da imunidade celular, o centro do granuloma sofre um processo  
 3 de necrose de caseificação, induzido pelo BK, através da estimulação da produção  
 4 de TNF- $\alpha$  e LAM (CAMPOS, 2006; ETNA et al., 2014; SRIVASTAVA; ERNST,  
 5 2014).

6 A citocina TNF- $\alpha$  tem um papel central na formação do granuloma e, desde  
 7 a implicação do uso dos anti-TNF- $\alpha$ , uma maior taxa de incidência de tuberculose  
 8 foi relatada. Assim, todo paciente candidato ao uso de bloqueadores de TNF- $\alpha$   
 9 deve ser avaliado quanto à tuberculose latente (RABAHI et al., 2017).

10 A interleucina-17 (IL-17), produzida principalmente por um subconjunto de  
 11 células pró-inflamatórias TCD4<sup>+</sup> conhecido como as células Th17, tem sido  
 12 associado com a proteção contra a tuberculose. Tem-se sugerido que essas  
 13 células dão um importante contributo para a resposta imune anti-micobacteriana  
 14 humana, principalmente através da formação de um granuloma induzido pela  
 15 infecção (Figura 4) (KHADER et al., 2007; UMEMURA et al., 2007; KHADER;  
 16 COOPER, 2008; SCRIBA et al., 2008; YOSHIDA et al., 2010; ETNA et al., 2014;  
 17 MCALEER; KOLLS, 2014).



18

19 **Figura 4. Reconhecimento bacteriano.** As células dendríticas (DC) maduras expressam em sua  
 20 superfície um nível elevado de moléculas MHC classe I e classe II, que se ligam ao TCR presente  
 21 na membrana das células TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, tanto as naives como as de memória. Para otimizar a  
 22 iniciação de células TCD4<sup>+</sup> específicas de Ag, as DC residentes nos linfonodos apresentam o  
 23 antígeno da *Mycobacterium tuberculosis* como proteínas solúveis degradadas, que são liberadas de  
 24 DC migratórias e monócitos inflamatórios (A). Ao contrário da DC, os macrófagos ativados (M1)  
 25 estão envolvidos principalmente na estimulação da memória das células TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que  
 26 ocorrem no tecido infectado (B). A geração de subconjuntos específicos de linfócitos T depende

1 fortemente do meio de citocinas produzido pela APC. Em particular, as DC possuem a capacidade  
2 peculiar para produzir IL-12, IL-23, IL-27 e IFN- $\beta$  enquanto macrófagos os principais produtores de  
3 outros mediadores pro-inflamatórios e reguladores, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-18, IL-10 e TGF- $\beta$   
4 (ETNA et al., 2014).

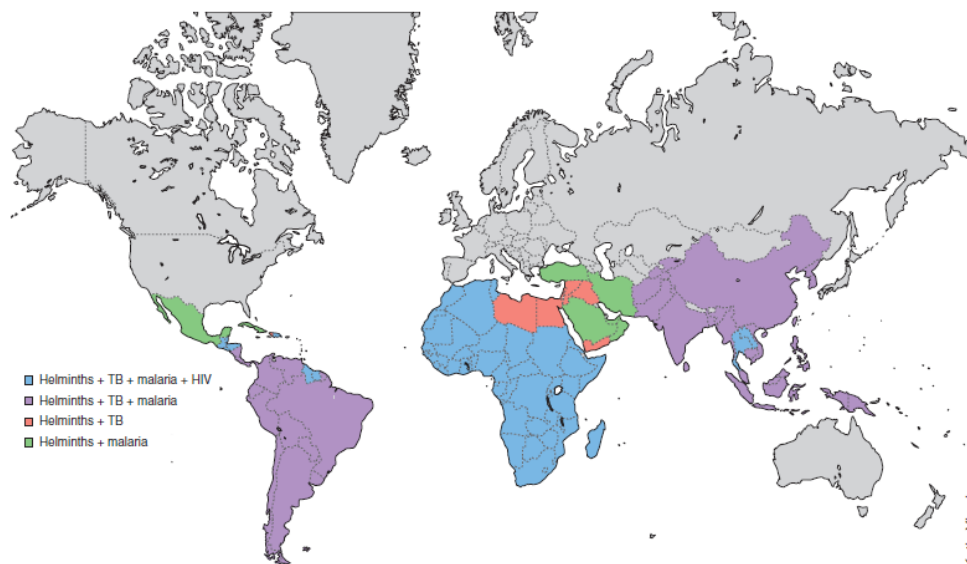
5  
6 No caso de *M. tuberculosis*, devido a imunidade protetora que impede sua  
7 multiplicação, a eliminação completa do bacilo pode não ocorrer. Por essa razão  
8 indivíduos em uso de corticosteroides e portadores de HIV podem desenvolver  
9 manifestações clínicas da tuberculose, mesmo infectados há muito tempo e terem  
10 persistido completamente assintomáticos (MACHADO et al., 2004; ETNA et al.,  
11 2014).

### 12 13 **1.5.1. Epidemiologia, diagnóstico e tratamento da tuberculose**

14  
15 Dados epidemiológicos demonstram que um terço da população mundial  
16 está infectada com *M. tuberculosis* e 10,4 milhões de pessoas adoeceram de  
17 tuberculose no mundo em 2016 e cerca de 1,3 milhão de pessoas morreram em  
18 decorrência da doença (WHO, 2017).

19 Os principais patógenos globais, incluindo o *Mycobacterium tuberculosis*,  
20 vírus da imunodeficiência humana (HIV) e as espécies de *Plasmodium* spp. que  
21 causam a malária, podem se sobrepor na distribuição geográfica em relação às  
22 infecções concomitantes com helmintos (Figura 5).

23



**Figura 5.** Mapa-múndi mostrando a distribuição geográfica da coinfeção com helmintos juntamente com tuberculose, malária ou infecção por HIV em adultos (SALGAME et al., 2013).

Segundo Ministério da Saúde (2018), os dados divulgados mostram que o Brasil registrou 69.569 novos casos de tuberculose em 2017. A taxa de incidência da doença no país ficou em 33,5 casos para cada 100 mil habitantes. Enquanto os dados sobre o número de mortes por tuberculose referentes a 2016 demonstram um total de 4.426 indicando um coeficiente de mortalidade igual a 2,1 óbitos/100 mil habitantes. segundo o documento *Global Tuberculosis Report (2016)*, atualmente, o país ocupa a 20ª posição com maior carga de tuberculose.

No município de Londrina-PR, nos anos de 2001 a 2008 foram registradas 1418 notificações de pacientes com diagnóstico de tuberculose. Dessas notificações 1203 foram de residentes em Londrina e 215 de residentes de outros municípios. Apenas 3,7% dos casos os pacientes estavam institucionalizados: foram presídio 26 casos, seguido de hospital psiquiátrico dois casos e asilo um caso. Dentre os agravos comumente associados à tuberculose verificou-se que a AIDS e o alcoolismo foram os mais frequentes (JUNIOR, 2011).

De acordo com informações da Secretaria Municipal de Saúde, em 2017 foram diagnosticados 136 casos de tuberculose em Londrina, com uma incidência correspondente a 24,4 casos para cada 100 mil habitantes. Nesse contexto, ainda houve um grande número de casos com diagnóstico tardio e abandonos no

1 tratamento, mesmo assim, esse número poderia ser ainda maior, se o diagnóstico  
2 estivesse ao alcance de toda população.

3 O número de casos em homens é o dobro daquele em mulheres.  
4 Populações vulneráveis e vivendo em grandes cidades apresentam taxas de  
5 incidência maiores do que a média da população geral. A população carcerária,  
6 apresenta elevadas taxas, cerca de 25 vezes maiores que a população geral, os  
7 portadores de HIV/AIDS, com taxas 30 vezes maiores, e indivíduos vivendo em  
8 ruas, com taxas 67 vezes maiores (PILLER, 2012). Em 2017, no Brasil, 73,4% dos  
9 casos novos de tuberculose foram testados para HIV, sendo que, 9,2%  
10 apresentavam coinfeção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018) Em Londrina,  
11 levantamento realizado por Bosqui e colaboradores (2017), relataram o número de  
12 casos de pacientes positivos para tuberculose em associação com HIV/AIDS, o  
13 qual correspondeu a 32/37% dos casos analisados com idade entre 24 e 59 anos,  
14 padrão semelhante aos casos relatados na literatura, onde demais autores  
15 identificaram que a faixa etária predominante nos casos de tuberculose/HIV ocorre  
16 em jovens adultos, compondo uma parcela significativa da população  
17 economicamente ativa (LEMOS et al., 2012; SANDGREN; HOLLO; VAN DER  
18 WERF, 2013).

19 Em 1981, o surgimento e a disseminação da AIDS mudaram o perfil  
20 epidemiológico da tuberculose, resultando no aumento da morbidade e da  
21 mortalidade em todo o mundo. A tuberculose e o HIV têm uma interação sinérgica,  
22 na qual cada um acentua a progressão do outro. A infecção por HIV é o maior fator  
23 de risco conhecido para o desenvolvimento de tuberculose ativa. Pessoas  
24 infectadas por HIV têm alto risco de progredir para tuberculose ativa a partir de um  
25 foco de infecção primária, assim como a partir da reativação da tuberculose latente.  
26 A infecção por HIV também aumenta o risco de subseqüentes episódios de  
27 tuberculose por reinfecção exógena (GARCIA et al., 2009).

28 O diagnóstico clínico da TB é baseado na história (contato com pacientes  
29 com TB) e na avaliação dos sinais e sintomas apresentados pelo paciente. Já os  
30 achados laboratoriais, evidenciam níveis de glicose reduzidos, de proteínas altas,  
31 densidade de mais de 1.015, dosagem de ADA (adenosina deaminase) elevada (>

1 40 U/I) junto a outros dados laboratoriais que auxiliam na confirmação do  
2 diagnóstico. No país, 71,4% dos casos novos de tuberculose em 2017 e 2018  
3 realizaram diagnóstico por confirmação laboratorial. Para a melhoria do  
4 diagnóstico, o Ministério da Saúde promoveu a expansão da Rede de Teste Rápido  
5 da Tuberculose, com a distribuição de 70 novos equipamentos para a realização do  
6 Teste Rápido Molecular (Gene-Xpert), baseado na detecção de fragmentos de  
7 DNA do bacilo em amostras de escarro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

8 Também muito utilizado para o diagnóstico são as radiografias baseando-se  
9 principalmente no infiltrado apical e subapical frequentemente concomitante a  
10 cavitação e ausência de adenopatia hilar, além do achado do bacilo em secreções  
11 e fluidos orgânicos (p. ex., exame do escarro). No exame bacteriológico realiza-se  
12 a pesquisa direta de BACILO ÁLCOOL - ÁCIDO RESISTENTE (BAAR) em lâminas  
13 coradas pelo método Ziehl-Neelsen. A cultura do bacilo em meio de Löwenstein-  
14 Jensen é o exame padrão-ouro para o diagnóstico (FOCHESATTO; BARROS,  
15 2013).

16 O diagnóstico imunológico é realizado com a prova tuberculínica, que  
17 consiste em uma hipersensibilidade tipo IV ou tardia. É efetuada por meio da  
18 inoculação intradérmica da protein purified derivated (PPD – componentes da  
19 parede do *M. tuberculosis*) na região anterior do antebraço esquerdo. Após 48 a 72  
20 horas é feita a medida da área de induração (FOCHESATTO; BARROS, 2013).  
21 Apesar de sua importância, o teste PPD não tem 100% de sensibilidade ou  
22 especificidade. Em média, 10 a 25% de pacientes com TB ativa não reagem ao  
23 PPD (TEIXEIRA et al., 2007).

24 Levantamentos populacionais em áreas com diferente risco de infecção por  
25 *M. tuberculosis* demonstraram acentuadas diferenças entre as áreas geográficas.  
26 O teste do PPD tem sensibilidade diminuída em populações de pacientes  
27 imunocomprometidos, pessoas recentemente infectadas e crianças muito jovens. A  
28 especificidade é baixa, pois o PPD contém diversos antígenos diferentes entre  
29 espécies de micobactérias, como *M. tuberculosis* e *M. bovis* (BCG) (ANDERSEN et  
30 al., 2000).

1 A reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, como a nested-  
 2 PCR, têm sido destacadas nos últimos anos, como técnicas moleculares  
 3 promissoras para o diagnóstico rápido da TB (ASSIS et al., 2007; MACHADO et al.,  
 4 2018). Preconiza-se o diagnóstico molecular da tuberculose em análise conjunta  
 5 com vários parâmetros, como baciloscopia, cultura, manifestações clínicas, prova  
 6 terapêutica e história prévia de tuberculose. Em 2014, o Ministério da Saúde  
 7 implantou no país a Rede de Teste Rápido para Tuberculose (RTR-TB,  
 8 denominado “Teste Rápido Molecular (TRM), conhecido também como *Xpert*  
 9 *MTB/Rif*®”, o teste detecta a presença do bacilo causador da doença em duas  
 10 horas e identifica se há resistência ao antibiótico rifampicina, um dos principais  
 11 medicamentos usados no tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

12 Imediatamente após o diagnóstico, o paciente que está bacilando, inicia o  
 13 tratamento, e após uma semana, deixa de ser fonte de contaminação para outras  
 14 pessoas. Atualmente, o tratamento da tuberculose no Brasil é padronizado pelo  
 15 Ministério da Saúde e consiste no uso de uma combinação de medicamentos que  
 16 congrega as substâncias rifampicina, isoniazida, etambutol e pirazinamida durante  
 17 seis meses oferecendo chance de cura próxima a 100% quando seguido  
 18 regularmente o período de tratamento (Tab. 1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

19

20 **Tabela 1.** Esquema Básico para o tratamento da tuberculose no Brasil, em adultos  
 21 e adolescentes.

Regime	Fármacos	Faixa de peso	Unidades/dose	Meses
<b>2RHZE</b>  Fase intensiva	<b>RHZE</b> 150/75/400/275 mg  comprimido em dose fixa combinada	20 a 35 kg	2 comprimidos	2
		36 a 50 kg	3 comprimidos	
		> 50 kg	4 comprimidos	
<b>4RH</b>  Fase de manutenção	<b>RH</b> 300/200 ou 150/100 mg  comprimido ou cápsula	20 a 35 kg	1 comp. ou cáps. 300/200 mg	4
		36 a 50 kg	1 comp. ou cáps. 300/200 mg + 1 comp. ou cáps. 150/100 mg	
		> 50 kg	2 comp. ou cáps. 300/200 mg	

22

1 Com o objetivo de controlar a doença, a Organização Mundial de Saúde  
2 recomenda o tratamento completo em, no mínimo, 85% dos casos diagnosticados.  
3 Mas para que seja possível, é necessária uma rede de serviços organizada e bem  
4 gerenciada, além da notificação compulsória obrigatória que é fundamental para a  
5 implementação de estratégias. Neste contexto, o Hospital Universitário de Londrina  
6 é referência à nível terciário para o tratamento de tuberculose, e apresenta-se  
7 como um dos municípios prioritários de acordo com o Programa Nacional de  
8 Controle da Tuberculose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; BOSQUI et al., 2017).

### 9 10 **1.5.2. Efeito da imunidade induzida por helmintos em infecções** 11 **microbianas**

12  
13 O efeito protetor da vacina BCG contra TB é significativamente prejudicado  
14 em animais infectados com helmintos (ELIAS et al., 2005; RAFI et al., 2015),  
15 indicando que infecções por helmintos podem prejudicar tanto a resposta Th1  
16 contra a tuberculose como a eficácia da vacina BCG (FERREIRA et al., 2002). No  
17 entanto, o impacto da imunomodulação induzida pelo parasito sobre a imunidade  
18 contra a tuberculose e sobre a eficácia da vacina BCG deve ser esclarecido.

19 Um estudo realizado por Tristão-Sá e colaboradores (2002), demonstraram a  
20 prevalência de nematoides intestinais em pacientes diagnosticados com TB e  
21 grupo controle, e concluíram que *S. stercoralis* foi mais prevalente do que outras  
22 espécies de nematoides entre os pacientes com tuberculose pulmonar. O mesmo  
23 foi observado por Cardoso e colaboradores (2017), que realizaram um estudo em  
24 pacientes portadores de tuberculose, no Estado do Pará, e comprovaram uma alta  
25 prevalência de helmintíases transmitidas pelo solo, em especial *S. stercoralis*.

26 George e colaboradores (2014), determinaram a frequência de células  
27 TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> e citocinas em pacientes portadores de TB com e sem infecções por  
28 helmintos, e os resultados demonstraram diminuição na frequência de células  
29 TCD4<sup>+</sup>, bem como nos níveis de citocinas inflamatórias Th1 (IFN-  $\gamma$ , TNF-  $\alpha$  e IL-2)  
30 e Th17 (IL-17), e um aumento de citocina anti-inflamatória IL-10, principalmente em  
31 pacientes co-infectados com *S. stercoralis*.

1           Silva e colaboradores (2014) realizaram um estudo utilizando fração  
2 detergente (D), purificado do extrato salino total (SE) de *Strongyloides*  
3 *venezuelensis*, na detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides stercoralis* em  
4 amostras de soro de pacientes procedentes de áreas endêmicas que  
5 apresentavam condições de imunocomprometimento como vírus da  
6 imunodeficiência humana (HIV (+)), diabetes mellitus tipo 2, câncer, tuberculose e  
7 alcoolismo. Os resultados demonstraram que a fração detergente foi eficaz para  
8 detecção de anticorpos IgG anti-*S. stercoralis* em indivíduos imunocomprometidos  
9 com estrogiloidíase e pode ser aplicado como uma ferramenta importante para o  
10 imunodiagnóstico da estrogiloidíase humana relacionada com a imunossupressão.

11           Estudos realizados por Carmo e colaboradores (2009) e Dias e  
12 colaboradores (2011), utilizando modelo murino infectado com *M. bovis* após uma  
13 infecção por *S. venezuelensis*, apresentaram redução na produção de interleucina-  
14 17 por células pulmonares e aumento da carga bacteriana com diminuição do  
15 tamanho dos granulomas e uma elevação no número de células que expressam  
16 a molécula inibidora CTLA-4 foram observados no pulmão, sugerindo que a  
17 infecção por helmintos intestinais poderia ter um efeito negativo sobre o controle da  
18 tuberculose e tornar os indivíduos coinfetados mais suscetíveis ao  
19 desenvolvimento de TB.

20           Macrófagos alternativamente ativados (M2), gerados durante a infecção por  
21 helmintos, podem reduzir potencialmente a atividade efetora dos macrófagos  
22 patógenos microbianos (M1). De fato, um estudo identificou o macrófago M2  
23 induzido pelo receptor de IL-4 como um potencial nicho para o crescimento  
24 aumentado de *M. tuberculosis* em hospedeiros coinfetados com helmintos  
25 (POTIAN et al., 2011). Outra questão inexplorada é a fonte de IL-4 e IL-13 que  
26 direciona a polarização de macrófagos para o fenótipo M2, principalmente durante  
27 os estágios iniciais da coinfecção. A descoberta de células linfoides inatas do tipo 2  
28 (células ILC2) também conhecidas como nuócitos, que se desenvolvem sob a  
29 influência de IL-25 ou IL-33 e, como as células Th2, produzem IL-5 e IL-13,  
30 aumenta a possibilidade que essas células poderiam ser uma fonte potencial de  
31 citocinas Th2 que dirigem a polarização M2 (NEILL et al., 2010; SPITS et al., 2013;

1 BABU; NUTMAN, 2016). Assim, durante infecções concomitantes, é possível que  
2 as células ILC2 ativadas após dano tecidual induzido por helmintos possam  
3 promover o desenvolvimento de macrófagos M2.

4 Neste contexto, a descoberta de que os macrófagos podem proliferar *in situ*  
5 durante uma resposta Th2 (JENKINS et al., 2011) realça ainda mais o potencial  
6 dos macrófagos M2 na regulação negativa das funções efetoras dos macrófagos  
7 M1 durante a coinfeção (SALGAME, 2013; TEGEGNE et al., 2018).

8 Outra descoberta, em relação a coinfeção entre TB e *S. stercoralis*, está  
9 relacionada com a modulação negativa da resposta humoral contra antígenos de  
10 *M. tuberculosis*. Anuradha e colaboradores (2017) demonstraram  
11 experimentalmente, uma correlação negativa entre os níveis de anticorpos IgM e  
12 IgG específicos para o *M. tuberculosis*, bem como, níveis de citocinas BAFF (fator  
13 de ativação do linfócito B) e o ligante indutor de proliferação (APRIL), por sua vez,  
14 relacionadas aos números de células B de memória e células plasmáticas.

15 A resistência promovida pela coinfeção desses patógenos, pode ocasionar  
16 uma exacerbação da infecção associada, e na ausência de controles  
17 imunorreguladores induzidos por helmintos, poderia contribuir potencialmente para  
18 o aumento da gravidade da doença (SALGAME et al., 2013).

19 Diante do aumento da incidência de tuberculose em regiões tropicais e  
20 subtropicais, regiões nas quais existe uma alta prevalência de parasitas  
21 gastrointestinais, sobretudo da estrogiloidíase, a utilização do imunodiagnóstico  
22 em amostras pareadas de soro e saliva, bem como a análise molecular em  
23 amostras fecais pode contribuir para um diagnóstico rápido e sensível da  
24 estrogiloidíase humana, permitindo um tratamento precoce dos indivíduos  
25 infectados, superando as limitações dos métodos atuais de diagnóstico desta  
26 helmintíase.

27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

## 2 JUSTIFICATIVA

O estudo da estrogiloidíase torna-se cada vez mais importante devido ao aumento de indivíduos imunocomprometidos, seja pelo uso de corticoides, transplantes de órgãos, neoplasias, infecção pelo HIV, desnutrição, aumento do consumo de bebidas alcoólicas ou até mesmo tuberculose. Nesses indivíduos a infecção assume caráter grave principalmente relacionado à hiperinfecção e infecção disseminada podendo por vezes, ser fatal.

Dados da distribuição da estrogiloidíase em âmbito mundial ainda são subestimados. No Brasil, apesar de pesquisas recentes apresentarem a ocorrência da mesma, ainda são escassos trabalhos regionais, especialmente em algumas regiões do Paraná, que demonstrem esses dados bem como a associação destes com a clínica e outros fatores. Dado importante uma vez que, a partir dessas relações, medidas de controle e atenção profilática podem impedir a severidade dos casos em muitos pacientes portadores da infecção.

Sabe-se que os testes parasitológicos específicos para a detecção de *S. stercoralis*, não apresentam a sensibilidade adequada e dependem também de variáveis como capacidade técnica, utilização correta dos métodos de detecção, tempo de realização entre outros fatores, para que resultados falso-negativos sejam evitados. Nesse sentido, a utilização de testes mais sensíveis e específicos como os imunológicos e biologia molecular, contribuem efetivamente no diagnóstico dessa parasitose, tornando ferramenta importante principalmente em casos onde a confirmação precoce se faz necessária.

Apesar de poucos relatos na literatura, a coinfeção entre tuberculose e estrogiloidíase, possui cenário relevante na epidemiologia da saúde pública, visto que, as duas enfermidades são de alta incidência e apresentam populações vulneráveis coincidentes. Além disso, a resistência promovida pela coinfeção desses patógenos, pode ocasionar a exacerbação da inflamação associada, e na ausência de controles imunorreguladores induzidos por helmintos, contribuir potencialmente para o aumento da gravidade da tuberculose.

Diante do aumento da incidência de tuberculose em regiões tropicais e subtropicais, regiões nas quais existe uma alta prevalência de parasitas

1 gastrointestinais, sobretudo da estrogiloidíase e devido à escassez de dados que  
2 associam as duas infecções, optou-se por investigar, a relação da estrogiloidíase  
3 na população e em pacientes portadores de tuberculose.

4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

### 1        3    **OBJETIVOS**

#### 2    **3.1.    Objetivo geral**

- 3
- 4    •        Investigar o perfil do diagnóstico coproparasitológico, imunológico e
- 5    molecular de indivíduos com estrogiloidíase e/ou portadores de tuberculose.

#### 6    **3.2.    Objetivos específicos**

- 7    •        Detectar anticorpos IgG e imunocomplexos anti-*S. stercoralis* em amostras
- 8    pareadas de soro e saliva.
- 9
- 10   •        Avaliar o teste Dot-ELISA para detecção de anticorpo IgA anti-*S. stercoralis*
- 11   em amostras de saliva.
- 12
- 13   •        Aplicar a reação em cadeia da polimerase convencional (PCRc) na detecção
- 14   de DNA de *S. stercoralis* em amostras de fezes.
- 15
- 16   •        Analisar o perfil clínico de pacientes positivos para tuberculose através de
- 17   um estudo epidemiológico, descritivo e retrospectivo, com base em dados
- 18   secundários contidos em prontuários dos pacientes atendidos no Hospital
- 19   Universitário de Londrina.
- 20
- 21   •        Coletar amostras de sangue, saliva e fezes de pacientes atendidos no
- 22   Centro de Referência para Tuberculose Dr. Bruno Piancastelli Filho da cidade de
- 23   Londrina.
- 24
- 25   •        Realizar testes coproparasitológicos por meio dos métodos de Rugai e
- 26   Hoffmann, Pons e Janer para pesquisa de ovos e larvas de helmintos ou cistos de
- 27   protozoários, bem como Cultura em Placa de Ágar para pesquisa de larvas de *S.*
- 28   *stercoralis*.

- 1 • Determinar a presença de anticorpos IgA, IgG e IC-IgG anti-*S. stercoralis* em  
2 amostras pareadas de saliva e soro de pacientes portadores de tuberculose, com  
3 auxílio do teste imunoenzimático (ELISA).  
4
- 5 • Realizar o diagnóstico molecular, através da técnica de PCR convencional e  
6 tempo real, utilizando amostras fecais dos pacientes portadores de tuberculose  
7
- 8 • Estabelecer a relação entre TB e a infecção por *S. stercoralis*, bem como a  
9 sensibilidade e especificidade entre os testes parasitológicos, imunológico e  
10 molecular.  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

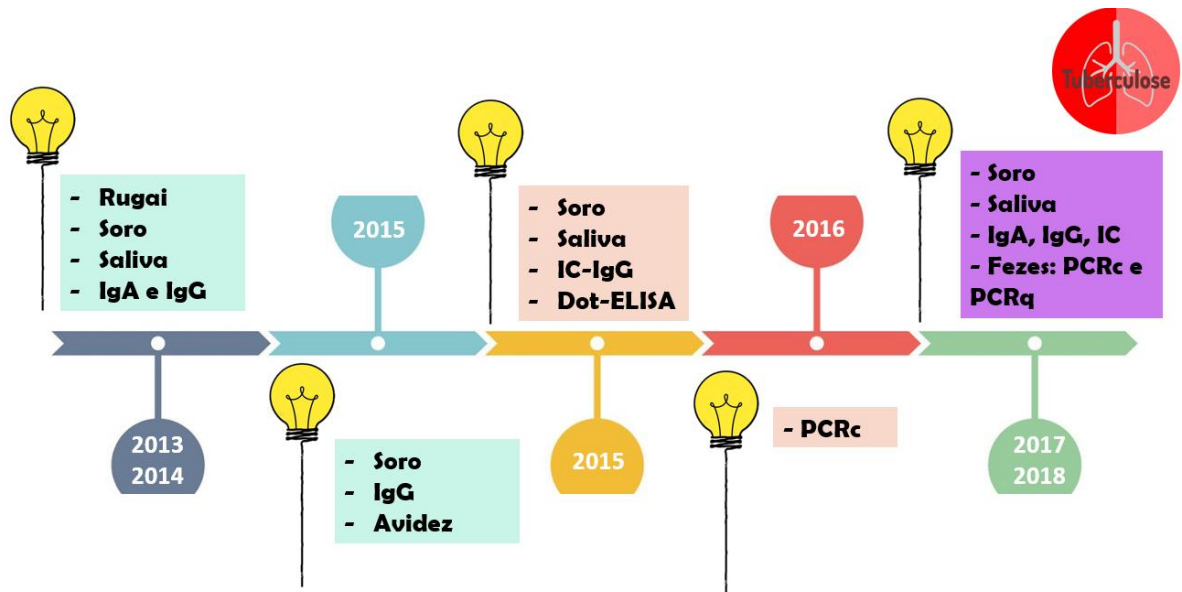


Figura 6. Histórico da pesquisa.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

## 1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2  
3 Segundo normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas: NBR 6023/2002

4  
5 ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6ª  
6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

7 ANDERSEN, P.; MUNK, M.E.; POLLOCK, J.M.; DOHERTY, T.M.; Specific immune-  
8 based diagnosis of tuberculosis. **Lancet**, v. 356, p.1099-104, 2000.

9 ANURADHA, R.; MUNISANKAR, S.; BHOOTRA, Y.; DOLLA, C.; KUMARAN, P.;  
10 NUTMAN, T. B.; BABU, S. Modulation of Mycobacterium tuberculosis - specific  
11 humoral immune responses is associated with *Strongyloides stercoralis* co-  
12 infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, e0005569, 2017.

13 ASSEFA, S.; ERKO, B.; MEDHIN, G.; ASSEFA, Z.; SHIMELIS, T. Intestinal  
14 parasitic infections in relation to HIV/AIDS status, diarrhea and CD4 T-cell count.  
15 **BioMed Central Infection Diseases**, v. 9, p.1-6, 2009.

16  
17 ASSIS, N. C. S.; LOPES, M.L.; CARDOSO, N.C.; LIMA, K. Diagnóstico molecular  
18 da tuberculose pulmonar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina**  
19 **Laboratorial**, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2007.

20  
21 ATKINS, N. S.; CONWAY, D. J.; LINDO, J.F.; BAILEY, J. W.; BUNDY, D. P. A. L3  
22 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlations  
23 with larval output. **Parasite Immunology**, v. 21, p. 517-526, 1999.

24  
25 ATKINS, N. S.; LINDO, J.F.; LEE, M. G.; CONWAY, D.J.; BAILEY, J.W.;  
26 ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. P. A. Humoral responses in human strongyloidiasis:  
27 correlations with infection chronicity. **Transactions of the Royal Society of**  
28 **Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, p. 609-613, 1997.

29  
30 BABU, S.; NUTMAN, T. B. Helminth-Tuberculosis Co-infection: An Immunologic  
31 Perspective. **Trends in Immunology**, v. 37, p. 597–607, 2016.

32  
33 BAERMANN, G. Eine einfache methode zur auffindung von Ancklostomun  
34 (Nematodes) larven in Erdpnoen. Mededul. Nnith in, Geneesk. **Laboratories**  
35 **Weltreve Feestbundel**, p. 41-47, 1917.

36  
37 BASUNI, M.; MUHI, J.; OTHMAN, N.; VERWEIJ, J.J.; AHMAD, M.; MISWAN, N.;  
38 RAHUMATULLAH, A.; AZIZ, F.A.; ZAINUDIN, N.S.; NOORDIN, R. A Pentaplex  
39 Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Four Species of Soil-  
40 Transmitted Helminths. **The American Journal of Tropical Medicine and**  
41 **Hygiene**, v. 84, p. 338-343, 2011.

42

- 1 BAVAY, A. Sur languilule intestinale (*Anguillulla intestinalis*) nouveau ver  
2 nýmatoide trove par le Dr. Normand chez les nalades atteints de diarrhea de  
3 Cochinchine. **Compose Rend. Science Biologique**, v. 84, p. 258-266, 1876.
- 4
- 5 BENCKERT J, SCHMOLKA N, KRESCHEL C, ZOLLER MJ, STURM A,  
6 WIEDENMANN B, Wardemann H. The majority of intestinal IgA+ and IgG+  
7 plasmablasts in the human gut are antigen-specific. **Journal of Clinical**  
8 **Investigation**, v. 121, p.1946-5510, 2011.
- 9
- 10 BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; MONTRESOR, A.; MÉNDEZ-REQUENA, A.;  
11 MUNOZ, J.; KROLEWIECKI, A.J.; GOTUZZO, E.; MENA, M.A.; CHIODINI, P.L.;  
12 ANSELM, M.; MOREIRA, J.; ALBONICO, M. *Strongyloides stercoralis*: a plea for  
13 action. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.7, e2214, 2013.
- 14 BLAISE, C. Role of secretory IgA in infection and maintenance of homeostasis.  
15 **Autoimmunity Reviews**, v.12, p. 661-665, 2013.
- 16
- 17 BLANCO, R.M.; TAKEI, K.; ROMERO, E.C. Leptospiralglycolipoprotein as a  
18 candidate antigen for serodiagnosis of human leptospirosis. **Letters in Applied**  
19 **Microbiology**, v.49, p. 267-273, 2009.
- 20
- 21 BOSCOLO, M.; GOBBO, M.; MANTOVANI, W.; DEGANI, M.; ANSELM, M.;  
22 MONTEIRO, G. B.; MAROCCO, S.; ANGHEBEN, A.; MISTRETTA, M.;  
23 SANTACATTERINA, M.; TAIS, S.; BISOFFI, Z. Evaluation of an indirect  
24 immunofluorescence assay for strongyloidiasis as a tool for diagnosis and follow-up.  
25 **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, p.129-133, 2007.
- 26
- 27 BOSQUI, L. R.; GONÇALVES, A. L. R.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.;  
28 PAVANELLI, W. R.; CONCHON-COSTA, I.; COSTA-CRUZ, J. M.; COSTA, I. N.  
29 Immunocomplex detection in saliva samples: a innovative proposal for the diagnosis  
30 of human strongyloidiasis. **Parasitology**, v.145, p.1090-109, 2018.
- 31
- 32 BOSQUI, L. R.; SILVA, S. S.; SANFELICE, R. A.; SAPLA, M. M. M.; ALVARENGA,  
33 D. S.; LUCAS, B. B.; MACHADO, L. F.; MELANDA, F. N.; CUSTODIO L. A.;  
34 PAVANELLI, W. R.; CONCHON-COSTA, I.; COSTA, I. N. Clinical profile of patients  
35 diagnosed with tuberculosis treated at the University Hospital of Londrina, Paraná.  
36 **Semina: Ciências biológicas e da saúde**, v. 38, n. 1, p. 89-98, 2017.
- 37
- 38 BOSQUI, L.; GONCALVES A. L.; GONCALVES-PIRES M. R. F.; CUSTODIO L. A.;  
39 DE MENEZES, M. C.; MURAD, V. A.; DE PAULA, F. M.; PAVANELLI, W. R.;  
40 CONCHON-COSTA, I.; COSTA-CRUZ, J. M.; COSTA, I. N. Detection of parasite-  
41 specific IgG and IgA in paired serum and saliva samples for diagnosis of human  
42 strongyloidiasis in northern Paraná state, Brazil. **Acta Tropica**, v. 50, p.190-195,  
43 2015.
- 44
- 45 BOSQUI, L.; PEREIRA, V. L; CUSTODIO L. A.; DE MENEZES, M. C. N. D;  
46 MURAD, V. A.; ALMEIDA, R. S.; PAVANELLI, W. R.; CONCHON-COSTA, I.;

- 1 COSTA-CRUZ, J. M.; COSTA, I. N. *Strongyloides stercoralis* and other intestinal  
2 parasites in human populations of northern Paraná region identified by using  
3 diferente parasitological methods. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 48,  
4 n. 2, p. 153-159, 2016.
- 5
- 6 BOULWARE, D. R.; STAUFFER, W. M.; HENDEL-PATERSON, B. R.; ROCHA, J.  
7 L. L.; SEET, R. C. S.; SUMMER, A. P.; NIELD, L. S.; SUPPARATPINYO, K.;  
8 CHAIWARITH, R.; WALKER, P. F. Maltreatment of *Strongyloides* infection: case  
9 series and worldwide physicians in training survey. **The American Journal of**  
10 **Medicine**, v.120, p. 545-551, 2007.
- 11
- 12 BUONFRATE D, SEQUI M, MEJIA R, CIMINO RO, KROLEWIECKI AJ, ALBONICO  
13 M, DEGANI M, TAIS S, ANGHEBEN A, REQUENA-MENDEZ A, MUNˆOZ J,  
14 NUTMAN TB, BISOFFI Z. Accuracy of five serologic tests for the follow up of  
15 *Strongyloides stercoralis* infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9,  
16 e0003491, 2015.
- 17
- 18 BRANDTZAEG, P. Structure, synthesis and external transfer of mucosal  
19 immunoglobulins. **Annales de Immunologie**, v. 124, p. 417-438, 1973.
- 20
- 21 BRANDTZAEG, P. Mucosal and glandular distribution of immunoglobulin  
22 components. Immunohistochemistry with a cold ethanol-fixation technique.  
23 **Immunology** v. 26, p.1101-1114, 1974.
- 24
- 25 BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-  
26 fed infant. **Vaccine**, v. 21, p. 3382–3388, 2003.
- 27
- 28 BRANDTZAEG, P. Secretory immunity with special reference to the oral cavity.  
29 **Journal of Oral Microbiology**, v. 5, p. 1-24, 2013.
- 30
- 31 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano Nacional de Vigilância e Controle das**  
32 **Enteroparasitoses**. Brasília, DF, 2005.
- 33
- 34 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Panorama da tuberculose no Brasil:**  
35 **indicadores epidemiológicos e operacionais**. Brasília: Ministério da Saúde,  
36 2014.
- 37
- 38 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE.  
39 **Implantação do Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de**  
40 **Saúde Pública no Brasil: primeiros passos rumo ao alcance das metas**. **Boletim**  
41 **Epidemiológico**, v. 49, n. 11, p. 1-18, 2018.
- 42
- 43 BUENO, E. C.; VAZ, A. J.; MACHADO, L. D.; LIVRAMENTO, J. A.  
44 Neurocysticercosis: detection of IgG, IgA and IgE antibodies in cerebrospinal fluid,  
45 serum and saliva samples by ELISA with *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*  
46 antigens. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 58, n. 1, p. 18-24, 2000.

- 1  
2 BUTLER, J.E. Immunoglobulins and immunocytes in animal milks. In: **Mucosal**  
3 **Immunology**. Academic Press, 1999.  
4
- 5 CAMPOS, H.S. Tuberculosis: etiopathogenesis and clinical presentations. **Pulmão**  
6 **RJ**, v. 15, p. 29-35, 2006.  
7
- 8 CARDOSO, B. A.; FONSECA, F. O.; MORAES NETO, A. H. A.; MARTINS, A. C. G.  
9 S.; OLIVEIRA, N. V. S.; LIMA, L. N. G. C.; DIAS, G. A. S.; SAAD, M. H. F.  
10 Environmental aspects related to tuberculosis and intestinal parasites in a low-  
11 income community of the Brazilian Amazon. **Revista do Instituto de Medicina**  
12 **Tropical de São Paulo**, v. 59, p. e57, 2017.  
13
- 14 CARMO, A. M.; VICENTINI, M.A.; DIAS, A.T.; ALVES, L.L.; BRANDI, J.S.; DE  
15 PAULA, M.L.; FERNANDES, A.; BARSANTE, M.M.; SOUZA, M.A.; TEIXEIRA,  
16 H.C.; NEGRÃO-CORRÊA, D.; FERREIRA, A.P. Increased susceptibility to  
17 *Strongyloides venezuelensis* in mice due to *Mycobacterium bovis* co-infection which  
18 modulates production of Th2 cytokines. **Parasitology**, v.136, p. 1357-1365, 2009.  
19
- 20 CHODIRKER, W. B.; TOMASI, T. B. Jr Low-molecular-weight rheumatoid factor.  
21 **Journal of Clinical Investigation**, v. 42, p. 876–884, 1963.  
22
- 23 CONLEY, M. E.; DELACROIX, D. L. Intravascular and mucosal immunoglobulin A:  
24 two separate but related systems of immune defense. **Annals of Internal**  
25 **Medicine**, v. 9. p. 106-892, 1987.  
26
- 27 CONWAY, D.J, ATKINS, N.S.; LILLYWHITE, J.E.; BAILEY, J.W; ROSBSON, R.D.;  
28 LINDO, J.F.; BUNDY, D.A.; BIANCO, A.E. Immunodiagnosis of *Strongyloides*  
29 *stercoralis* infection: a method for increasing the specificity of indirect ELISA.  
30 **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, p.  
31 173-176, 1993.  
32
- 33 COSTA, I. N.; SOPELETE, M.C.; GONÇALVES-PIRES, M.R.F.; COSTA-CRUZ,  
34 J.M. IgA and IgG antibodies in paired serum and saliva samples in human  
35 strongyloidiasis. **Acta Parasitologica**, v. 48, p. 306-311, 2003.  
36
- 37 COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides* spp. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**,  
38 13. ed., São Paulo: Atheneu, 2016.  
39
- 40 COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* In: NEVES, D. P.; de MELO, A. L.;  
41 LINARDI, P. M; ALMEIDA VITOR R.W. **Parasitologia Humana**, p. 295-305, São  
42 Paulo: Atheneu, 2011.  
43
- 44 COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* In: NEVES, D. P.; de MELO, A. L.;  
45 LINARDI, P. M; ALMEIDA VITOR R.W. **Parasitologia Humana**, 11 ed., p. 295-305,  
46 São Paulo: Atheneu, 2005.

- 1  
2 COSTA-CRUZ, J.M.; BULLAMAH, C.B.; GONÇALVES-PIRES, M.R.F.; CAMPOS,  
3 D. M. B.; VIEIRA, M. A. Cryo-microtome cuts of coproculture larvae of *Strongyloides*  
4 *stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen source for the immunodiagnosis of  
5 human strongyloidiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**,  
6 v. 39, p. 313-317, 1997.  
7
- 8 DE BONA, S.; BASSO, R.M.C. Hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis*  
9 associada ao uso crônico de corticosteroide. **Revista Brasileira de Análises**  
10 **Clínicas**, v. 40, p. 247-250, 2008.  
11
- 12 DE CARVALHO, C.; PARTATA, A. K.; HIRAMOTO, R. M.; BORBOREMA, S. E. T.;  
13 MEIRELES, L. R.; NASCIMENTO, N. d.; de ANDRADE, H. F. Jr. A simple immune  
14 complex dissociation ELISA for leishmaniasis: standardization of the assay in  
15 experimental models and preliminary results in canine and human samples. **Acta**  
16 **Tropica**, v. 125, p. 128-136, 2013.  
17
- 18 DELACROIX, D. L; HODGSON, H. J; MCPHERSON, A.; DIVE, C.; VAERMAN, J.  
19 P. Selective transport of polymeric immunoglobulin A in bile. Quantitative  
20 relationships of monomeric and polymeric immunoglobulin A, immunoglobulin M,  
21 and other proteins in serum, bile, and saliva. **Journal of Clinical Investigation**, v.  
22 70, p. 230-241, 1982.  
23
- 24 DEVAULT, G. A. JR.; KING, J. W.; ROHR, M. S.; LANDRENEAU, M. D.; BROWN,  
25 S. T.; McDONALD, J. C. Opportunistic infection with *Strongyloides stercoralis* in  
26 renal transplantation. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 12, p. 653 -671, 1990.  
27
- 28 DEVI, U.; BORKAKOTY, B.; MAHANTA, J. Strongyloidiasis in Assam, India: a  
29 community-based study. **Tropical Parasitology**, v. 1, p. 30-32, 2011.  
30
- 31 DIAS, A. T.; CASTRO, S. B. R.; ALVES, C. C. S.; REZENDE, A. B.; RODRIGUES,  
32 M. F.; MACHADO, R. R. P.; FERNANDES, A.; CORREA, D. N.; TEIXEIRA, H. C.;  
33 FERREIRA, A. P. Lower production of IL-17A and increased susceptibility to  
34 *Mycobacterium bovis* in mice coinfecting with *Strongyloides venezuelensis*.  
35 **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 617-619, 2011.  
36
- 37 DOETZE, A.; SATOQUINA, J.; BURCHARD, G.; RAU, T.; LOLIGER, C.;  
38 FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. SATOQUINA, J.; BURCHARD, G. Antigen-specific  
39 cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by  
40 Th3/Tr1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor- $\beta$  but not by a Th1 to  
41 Th2 shift. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.12, p.623-630,  
42 2000.  
43
- 44 DONG L, YOO HB, WANG J, PARK SR. Accurate quantification of supercoiled  
45 DNA by digital PCR. **Scientific Reports**, v. 6, e24230, 2016.  
46

- 1 DOORN, H. R.; KOELEWIJN, R.; HOFWEGEN, H.; GILIS, H.; WETSTEYN, J. C. F.  
2 M.; WISMANS, P. J.; SARFATI, C.; VERVOORT, T.; GOOL, T. Use of enzyme  
3 linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides*  
4 *stercoralis* infection in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.438-442,  
5 2007.
- 6  
7 DORRIS, M.; BLAXTER, M. The small subunit ribosomal RNA sequence of  
8 *Strongyloides stercoralis*. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 939-941,  
9 2000.
- 10  
11 ELIA, C.C.S. Parasitoses intestinais. In: ELIA, C.C.S.; SOUZA, H.S.P. Imunologia  
12 da mucosa intestinal: da bancada ao leito. **Atheneu**, 1 ed, cap. 7.5, p. 137-140,  
13 2001.
- 14  
15 ELIAS, D.; AKUFFO, H.; PAWLOWSKI, A.; HAILE, M.; SCHON, T.; BRITTON, S.  
16 *Schistosoma mansoni* infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination  
17 against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine**, v.23, p. 1326-334, 2005.
- 18  
19 ELLIOT, D. E.; SUMMERS, R. W.; WEINSTOCK, J. V. Helminths as governors of  
20 immune-mediated inflammation. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p.  
21 457-464, 2007.
- 22  
23 ETNA, M. P.; GIACOMINI, E.; SEVERA, M.; COCCIA, E. M. Pro-and anti-  
24 inflammatory cytokines in tuberculosis: a two-edged sword in TB pathogenesis.  
25 **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 543-551, 2014.
- 26  
27 FALAVIGNA, D. L. M.; ALMEIDA, A. A.; IWAZAKI, R. S.; ARAÚJO, S. M. Intestinal  
28 parasites in ecotourism region of the state of Paraná, Brazil. **Brazilian Archives of**  
29 **Biology and Technology**, v. 51, p. 693-699, 2008.
- 30  
31 FARDET, L.; GÉNÉREAU, T.; POIROT, J. L.; GUIDET, B.; KETTANEH, A.;  
32 CABANE, J. Severe strongyloidiasis in corticosteroid-treated patients: case series  
33 and literature review. **Journal of Infection**, v. 54, p.18-27, 2007.
- 34  
35 FAUST, E. C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J. Comparative efficiency of various techniques  
36 for diagnosis of protozoa and helminthes in feces. **Journal of Parasitology**, v. 25,  
37 p. 241-262, 1939.
- 38  
39 FELICIANO, N. D.; GONZAGA, H.T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.;  
40 GONÇALVES, A. L. R.; RODRIGUES, R. M.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M.  
41 Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human  
42 immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious**  
43 **Disease**, v.67, p.153-161, 2010.
- 44  
45 FERREIRA, A. P.; AGUIAR, A. S.; FAVA, M. W. B.; CORRÊA, J. O. A.; TEIXEIRA,  
46 F. M.; TEIXEIRA, H. C. Can the efficacy of Bacille Calmette-Guérin tuberculosis

- 1 vaccine be affected by intestinal parasitic infections? **The Journal of Infectious**  
2 **Diseases**, v.186, p. 441-442, 2002.
- 3
- 4 FERREIRA, M. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Estrongiloidíase. IN: CIMERMAN, S.;  
5 CIMERMAN, B. **Medicina Tropical**, Atheneu: p. 241-251, 2003.
- 6
- 7 FERREIRA, M. S.; NISHIOKA, A. S.; BORGES, A. S.; COSTA-CRUZ, J. M.;  
8 ROSSIN, I. R.; ROCHA, A.; SILVESTRE, M. T. A.; ARAÚJO, F. F. N.  
9 Strongyloidiasis and infection due to human immunodeficiency virus: 25 cases of  
10 hyperinfection syndrome. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, p. 154-155, 1999.
- 11
- 12 FOCHESSATTO, F. L.; BARROS E. Medicina Interna na Prática Clínica. Porto  
13 Alegre: **Artmed**, 2013.
- 14
- 15 FOGAÇA, H. S.; ELIA, C. C. S.; MADI, K.; OLIVEIRA, A. Estudo das  
16 imunoglobulinas intestinais na estrongiloidíase. **A Folha Médica**, v. 101, p. 229-  
17 235, 1990.
- 18
- 19 GALIOTO, A. M.; HESS, J. A.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A.; LEE, J. J.; ABRAHAM,  
20 D. Role of eosinophils and neutrophils in innate and adaptive protective immunity to  
21 larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 5730-  
22 5738, 2006.
- 23
- 24 GARCIA-PELAYO, M. C.; UPLEKAR, S.; KENIRY, A.; MENDOZA-LOPEZ, P.;  
25 GARNIER, T.; NUNEZ-GARCIA, J.; BOSCHIROLI, L.; ZHOU, X.; PARKHILL, J.;  
26 SMITH, N.; HEWINSON, R. G.; COLE, S. T.; GORDON, S. V. A comprehensive  
27 survey of single nucleotide polymorphisms (SNPs) across *Mycobacterium bovis*  
28 strains and *M. bovis* BCG vaccine strains refines the genealogy and defines a  
29 minimal set of SNPs that separate virulent *M. bovis* strains and *M. bovis* BCG  
30 strains. **Infection and Immunity**, v. 77, e2230-8, 2009.
- 31
- 32 GENTA, R. M. Predictive value of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)  
33 for the serodiagnosis of strongyloidiasis. **American Journal of Clinical Pathology**,  
34 v. 89, p. 391-394, 1988.
- 35
- 36 GENTA, R. M. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with  
37 epidemiologic insights into prevention of disseminated disease. **Journal of**  
38 **Infectious Diseases**, v. 11, p. 755-767, 1989.
- 39
- 40 GEORGE, P. J.; ANURADHA, R.; KUMAR, N. P.; SRIDHAR, R.; BANUREKHA, V.  
41 V.; NUTMAN, T. B.; BABU, S. Helminth Infections Coincident with Active Pulmonary  
42 Tuberculosis Inhibit Mono- and Multifunctional CD4+ and CD8+ T Cell Responses  
43 in a Process Dependent on IL-10. **PLoS Pathogens**, v.10, e1004375, 2014.
- 44
- 45 GINDERACHTER, J. O. A.; MOVAHEDI, K.; GHASSABEH, G. H.; MEERSCHAUT,  
46 S.; BESCHIM, A.; RAES, G.; BAETSELIER, P. D. Classical and alternative

- 1 activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor  
2 promotion. **Immunobiology**, v. 211, p. 487-501, 2006.
- 3
- 4 GOMEZ-JUNYENT, J.; PAREDES-ZAPATA, D.; DE LAS PARRAS, E. R.;  
5 GONZÁLEZ-COSTELLO, J.; RUIZ-ARRANZ, A.; CAÑIZARES, R.; SAUGAR, J. M.;  
6 MUÑOZ, J. "Real-time polymerase chain reaction in stool detects transmission of  
7 *Strongyloides stercoralis* from an infected donor to solid organ transplant  
8 recipients," **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p.  
9 897–899, 2016.
- 10
- 11 GONÇALVES, A. L. R.; ROCHA, C. A.; GONZAGA, H. T.; GONÇALVES-PIRES, M.  
12 R. F.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Specific IgG and IgA to larvae,  
13 parthenogenetic females and eggs of *Strongyloides venezuelensis* in the  
14 immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and**  
15 **Infectious**, v. 72, p. 79-84, 2012a.
- 16
- 17 GONÇALVES, A. L. R.; NUNES, D. S.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; UETA, M.  
18 T.; COSTA-CRUZ, J. M. Use of larval, parasitic female and egg antigens from  
19 *Strongyloides venezuelensis* to detect parasite-specific IgG and immune complexes  
20 in immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Parasitology**, v. 139, p. 956-961,  
21 2012b.
- 22
- 23 GONZAGA, H. T.; RIBEIRO, V. S.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; UETA, M. T.; COSTA-  
24 CRUZ, J. M. Usefulness of concanavalin-A non-binding fraction of *Strongyloides*  
25 *venezuelensis* larvae to detect IgG and IgA in human strongyloidiasis. **Diagnostic**  
26 **Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, p. 78-84, 2011.
- 27
- 28 GROVE, D. I. Human strongyloidiasis. **Advances in Parasitology**, v. 38, p. 251-  
29 309, 1996.
- 30
- 31 GROVE, D. I.; BLAIR, A. J. Diagnosis of human strongyloidiasis by  
32 immunofluorescence, using *Strongyloides ratti* and *Strongyloides stercoralis*  
33 larvae. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 344-349, 1981.
- 34
- 35 GUILLAMET, L. J. V.; SAUL, Z.; MILJKOVIC, G.; VILCHEZ, G. A.; MENDONÇA,  
36 N.; GOURINENI, V.; LILLO, N.; PINTO, M.; BAIG, A.; GANGCUANGCO, L. M.  
37 *Strongyloides stercoralis* infection among human immunodeficiency virus (HIV)-  
38 infected patients in the United States of America: a case report and review of  
39 literature, **American Journal of Case Reports**, v. 18, p. 339-346, 2017.
- 40
- 41 GUIMARAES, S.; SOGAYAR, M. I. L. Detecção de anticorpos séricos anti-*Giardia*  
42 *lamblia* em crianças de creches. **Revista de Saúde Pública**. v. 36. n.1. p. 63-68,  
43 2002.
- 44
- 45 HEREMANS, J. F.; HEREMANS, M. T.; SCHULTZE, H. E. Isolation and description  
46 of a few properties of the beta 2A-globulin of humana serum. **Clinica Chimica Acta**  
v. 4, p. 96-102, 1959.

- 1  
2 HERNANDEZ-CHAVARRIA, F. *Strongyloides stercoralis*: um parasito subestimado.  
3 **Parasitologia** v.25, p. 40-49, 2001.  
4
- 5 HIRATA T; UCHIMA N; KISHIMOTO K; ZAHA O; KINJO N; HOKAMA A;  
6 SAKUGAWA H; KINJO F; FUJITA J. Impairment of host immune response against  
7 *Strongyloides stercoralis* by human T cell lymphotropic vírus type 1 infection.  
8 **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v. 74, p. 246-249, 2006.  
9
- 10 HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration  
11 method in Schistosomiasis mansoni, Puerto Rico. **Journal Public Health of**  
12 **Tropical Medicine**, v. 9, p. 283-291, 1934.  
13
- 14 HUGGINS, DONALD; MEDEIROS, LUZIDALVA BARBOSA DE; TAVARES,  
15 ERNANI; MALTA, LILIAN BRITTO LIRA; AGUIAR, TELMA CRISTINA. Tratamento  
16 da estrogiloidíase humana e outras parasitoses intestinais com dose única de  
17 ivermectina. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 58. p. 168-170, 2001.  
18
- 19 INÊS, E. J.; SILVA, M. L. S.; SOUZA, J. N.; TEIXEIRA, M. C. A.; SOARES, N. M.  
20 The role of glycosylated epitopes in the serodiagnosis of *Strongyloides stercoralis*  
21 infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, p. 31-35, 2013.  
22
- 23 IRIEMENAM, N.C.; SANYAOLU, A.O.; OYIBO, W. A.; FAGBENRO-BEYIOKU, A. F.  
24 *Strongyloides stercoralis* and the immune response. **Parasitology International**, v.  
25 59, p. 9-14, 2010.  
26
- 27 JENKINS, S. J.; RUCKERL, D.; COOK, P. C.; JONES, L. H.; FINKELMAN, F. D.;  
28 VAN ROOIJEN, N.; MAC DONALD, A. S.; ALLEN, J. E. Local macrophage  
29 proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2  
30 inflammation. **Science**, v. 332, p. 1284-1288, 2011.  
31
- 32 JUNIOR, W.L.C. **Avaliação dos casos de tuberculose notificados no município**  
33 **de Londrina no período de 2001 a 2008** (dissertação). 2011. 48p. Faculdade de  
34 Farmácia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.  
35
- 36 KADAOU, K. A.; CORTHESEY, B. Secretory IgA mediates bacterial translocation to  
37 dendritic cells in mouse Peyer's patches with restriction to mucosal compartment.  
38 **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 7751-7757, 2007.  
39
- 40 KASSALIK, M.; MONKEMULLER, K. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection  
41 syndrome and disseminated disease. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, p.  
42 766-768, 2011.  
43
- 44 KAUFMAN, E.; IRA, B.; LAMSTER, I. B. The diagnostic applications of saliva - a  
45 review. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 13, n. 2, p. 197-212,  
46 2002.

- 1 KEISER, P. B.; NUTMAN, T. B. *Strongyloides stercoralis* in the immune  
2 compromised population. **Reviews of Clinical Microbiology**, v. 17, p. 208-217,  
3 2004.
- 4
- 5 KEREPESI, L. A.; HESS, J. A.; LEON, O.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A.;  
6 ABRAHAM, D. Toll-like receptor 4 (TLR4) is required for protective immunity to  
7 larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 28-34,  
8 2007.
- 9
- 10 KHADER, S.; BELL, G.; PEARL, J.; FOUNTAIN, J.; RANGEL-MORENO, J.;  
11 CILLEY, G.; SHEN, F.; EATON, S.; GAFFEN, S.; SWAIN, S.; LOCKSLEY, R.;  
12 HAYNES, L.; RANDALL, T.; COOPER, A. IL-23 and IL-17 in establishment of  
13 protective pulmonary CD4. T cell responses upon vaccination and during  
14 *Mycobacterium tuberculosis* challenge. **Nature Immunology**, v. 8, p. 369-377,  
15 2007.
- 16
- 17 KHADER, S.A.; COOPER, A.M. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. **Cytokine** v. 41, p.  
18 79-83, 2008.
- 19 KOGA, K.; KASUYA, S.; KHAMBOONRUANG, C.; SUKHAVAT, K.; IEDA, M.;  
20 TAKATSUKA, N.; KITA, K.; OHTOMO, H. A modified agar plate method for  
21 detection of *Strongyloides stercoralis*. **The American Journal of Tropical**  
22 **Medicine and Hygiene**, v. 45, p. 518-521, 1991.
- 23
- 24 KRAMME, S.; NISSEN, N.; SOBLIK, H.; ERTTMANN, K., TANNICH, E.;  
25 FLEISCHER, B.; PANNING, M.; BRATTING, N. Novel real-time PCR for the  
26 universal detection of *Strongyloides* species. **Jounal of Medical Microbiology**, v.  
27 60, p. 454-458, 2011.
- 28
- 29 LAM, C. S.; TONG, M. K.; CHAN, K. M.; SIU, Y. P. Disseminated strongyloidiasis: a  
30 restrospective study of clinical course and outcome. **European Journal of Clinical**  
31 **Microbiology & Infectious Diseases**, v. 25, p. 14-18, 2006.
- 32
- 33 LEMOS, L. A.; FEIJÃO, A.R.; GIR, E.; GALVÃO, M. T. G. Aspectos da qualidade de  
34 vida de pacientes com coinfeção HIV/tuberculose. **Acta Paulista de**  
35 **Enfermagem**, v. 25, n. 1, p. 41-47, 2012.
- 36 LEUNG, V. K.; LIEW, C. T.; SUNG, J. J. Fatal strongyloidiasis in a patient with  
37 ulcerative colitis after corticosteroid therapy. **American Journal of**  
38 **Gastroenterology**, v. 92, p. 1383-1384, 1997.
- 39 LEVENHAGEN, M. A.; COSTA-CRUZ, J. M. Updade on immunologic and molecular  
40 diagnosis of human strongyloidiasis. **Acta Tropica**, v. 135, p. 33-43, 2014.
- 41
- 42 LINDO, J. F.; ATKINS, N. S.; LEE, M. G.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A. Long-  
43 term serum antibody isotype responses to *Strongyloides stercoralis* filiform antigens

- 1 in eight patients treated with ivermectin. **American Journal of Tropical Medicine**  
2 **and Hygiene**, v. 55, p. 474-476, 1996.
- 3
- 4 LOUFTY, M. R.; WILSON, M.; KEYSTONE, J. S.; KAIN, K. C. Serology and  
5 eosinophil count in the diagnosis and management of strongyloidiasis in a non-  
6 endemic area. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p.  
7 749- 752, 2002.
- 8
- 9 LOYOLA, A. M.; DURIGHETTO, A. F. JR.; SILVA, D. A.; MINEO, J. R. Anti-  
10 *Toxoplasma gondii* immunoglobulins A and G in human saliva and serum. **Journal**  
11 **of Oral Pathology & Medicine**, v. 26, n. 4, p. 187-191, 1997.
- 12
- 13 LUVIRA, V.; TRAKULHUN, K.; MUNGTHIN, M.; NAAGLOR, T.; CHANTAWAT, N.;  
14 PAKDEE, W.; PHIBOONBANAKIT, D.; DEKUMYOY, P. Comparative diagnosis of  
15 strongyloidiasis in immunocompromised patients. **American Journal of Tropical**  
16 **Medicine and Hygiene**, v. 95, n.2, p.401-404, 2016.
- 17
- 18 MAcDONALD, A.S.; ARAUJO, M.I.; PEARCE, E.J. Immunology of parasitic  
19 helminth infections. **Infection and Immunity**, v. 70, 427-433, 2002.
- 20
- 21 MACHADO, D.; COUTO, I.; VIVEIROS, M. Advances in the molecular diagnosis of  
22 tuberculosis: From probes to genomes. **Infection, Genetics and Evolution**, p.  
23 1348-1567, 2018.
- 24
- 25 MACHADO E. R.; UETA, M. T. GONÇALVES-PIRES M. R. F.; ALVES DE  
26 OLIVEIRA J. B.; FACCIOLI L. H.; COSTA-CRUZ J. M. *Strongyloides venezuelensis*  
27 alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked  
28 immune sorbent assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 849-851,  
29 2003.
- 30
- 31 MACHADO, E. R.; TEIXEIRA, E. M.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; LOUREIRO,  
32 Z. M.; ARAÚJO, R. A.; COSTA-CRUZ, J. M. Parasitological and immunological  
33 diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in patients with gastrointestinal cancer.  
34 **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 40, p. 154-158, 2007.
- 35
- 36 MACHADO, P. R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; & CARVALHO, E. M.  
37 Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiros de Dermatologia**,  
38 v. 79, p. 647-664, 2004.
- 39
- 40 MAIZELS, R. M.; PEARCE, E. J.; ARTIS, D.; YAZDANBAKHSH, M.; WYNN, T. A.  
41 Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. **The Journal of**  
42 **Experimental Medicine**, v. 206, p. 2059-2066, 2009.
- 43
- 44 MAMTA, S.; UDITA, S.; RAJESH, P.; AGGARWAL, S. K. Oral fluid: Biochemical  
45 composition and functions: A review. **Journal of pharmaceutical and biomedical**  
46 **sciences**, v. 37, n. 37, p. 1932-1941, 2013.

- 1 MARCILLA, A.; TRELIS, M.; CORTÉS, A.; SOTILLO, J.; CANTALAPIEDRA, F.;  
2 MINGUEZ, M. T.; VALERO, M. L.; SÁNCHEZ DEL PINO, M. M.; MUÑOZ-ANTOLI,  
3 C.; TOLEDO, R.; BERNAL, D. Extracellular Vesicles from Parasitic Helminths  
4 Contain Specific Excretory/Secretory Proteins and Are Internalized in Intestinal Host  
5 Cells. **PLoS One**, v. 7, p. e45974, 2012.
- 6  
7 MARCOS, L. A.; TERASHIMA, A.; DUPONT, H. L.; GOTUZZO, E. *Strongyloides*  
8 hyperinfection syndrome: an emerging global infectious disease. **Transactions of**  
9 **the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p. 314-318, 2008.
- 10  
11 MARRA, N. M.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; MACHADO, G. C.; ZORZELLA-  
12 PEZAVENTO, S. F. G.; FRANÇA, T. G. D.; ISHIKAWA, L. L. W.; AMARANTE, A. F.  
13 T.; SARTORI, A.; AMARANTE, M. R. V. Faecal examination and PCR to detect  
14 *Strongyloides venezuelensis* in experimentally infected Lewis rats. **Memórias do**  
15 **Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 57–61, 2010.
- 16  
17 MARUYAMA, H.; NISHIMAKI, A.; TAKUMA, Y.; KURIMOTO, M.; SUZUKI, T.;  
18 SAKATOKU, Y.; ISHIKAWA, M.; OHT, N. Successive changes in tissue migration  
19 capacity of developing larvae of an intestinal nematode *Strongyloides*  
20 *venezuelensis*. **Parasitology**, v. 132, p. 1-8, 2006.
- 21  
22 MCALEER, J. P.; KOLLS, J. K. Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate  
23 pulmonary immune defense. **Immunological reviews**, v. 260, p. 129-44, 2014.
- 24  
25 McDONALD, H. H.; MOORE, M. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection. **The New**  
26 **England Journal of Medicine**, v. 376, n. 24, p. 2376, 2017.
- 27  
28 McINTYRE, T.M.; STROBER, W. Gut-associated lymphoid tissue: Regulation of  
29 IgA B cell development. In: **Mucosal Immunology**, 1999.
- 30  
31 MEEUSEN, E. N. T.; BALIC, A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth  
32 parasites? **Parasitology today**, v.16, p. 95-101, 2000.
- 33  
34 MEJIA, R.; NUTMAN, T. B. Screening, prevention and treatment for hyperinfection  
35 syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*. **Current**  
36 **opinion in infectious diseases**, v. 25, p. 458-463, 2012.
- 37  
38 MELO, F. A. F. Tuberculose. In: VERONESI, R.F. **Tratado de Infectologia**. 4 ed.  
39 v.1. São Paulo: Editora Atheneu, v. 68, p.1263-1333, 2009.
- 40  
41 MENDES, T.; MINORI, K.; UETA, M.; MIGUEL, D. C.; ALLEGRETTI, S. M.  
42 “Strongyloidiasis Current Status with Emphasis in Diagnosis and Drug  
43 Research,” **Journal of Parasitology Research**, v. 2017, p. 1-13, 2017.
- 44  
45 MENDONÇA, S. C.; GONÇALVES-PIRES, M. DO R.; RODRIGUES, R. M.;  
46 FERREIRA, A. JR.; COSTA-CRUZ, J.M. Is there an association between positive

- 1 *Strongyloides stercoralis* serology and diabetes mellitus? **ActaTropica**, v. 99, p.  
2 102-105, 2006.
- 3
- 4 MERCADO, R.; JERCIC, M. I.; ALCAYAGA, S.; PAULA, F. M.; UETA, M. T.;  
5 COSTA-CRUZ, J. M. Seroepidemiological aspects of human *Strongyloides*  
6 *stercoralis* infections in Chile. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São**  
7 **Paulo**, v. 49, p. 247-249, 2007.
- 8
- 9 MERCADO, R.; JERCIC, M. I.; TORRES, P.; ALCAYAGA, S.; PAULA, F. M.;  
10 COSTA-CRUZ, J. M.; UETA, M. T. Immunodiagnosis of *Strongyloides stercoralis*  
11 infection in Chile using ELISA test. **Revista Medica Chilena**, v. 130, p. 1358-1364,  
12 2002.
- 13
- 14 MESTECKY, J.; McGEHEE, J. R. Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular  
15 interactions involved in IgA biosynthesis and immune responses. **Advances in**  
16 **immunology**, v. 40, p. 153, 1987.
- 17
- 18 MINISTÉRIO DA FAZENDA. PAC. Programa de Aceleração do Crescimento, 2007.  
19 Disponível em:<[www.fazenda.gov.br](http://www.fazenda.gov.br)>. Acesso em 20.04.2017.
- 20
- 21 MONTEIRO, R. C.; VAN DE WINKEL, J.G.J. IgA Fc Receptors. **Annual Review of**  
22 **Immunology**, v. 21. p. 177-204, 2003.
- 23
- 24 MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da  
25 estrogiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço Especial em Saúde Pública**, v.1, p.  
26 507-624, 1948.
- 27
- 28 MORI, J. C.; PIRES, M. C.; GALVÃO, C. E.; FERREIRA DE MELO, J.; GOLCHER,  
29 F. M.; MONTEALEGRE, F. Determination of *Blomia tropicalis*-specific IgE and IgG  
30 subclasses in atopic dermatitis patients. **Allergy**, v. 56, p. 180-184, 2001.
- 31
- 32 MOTA-FERREIRA, D. M. L.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; FERREIRA-JÚNIOR,  
33 A.; SOPELETE, M. C.; ABDALLAH, VOS.; COSTA-CRUZ, J. M. Specific IgA and  
34 IgG antibodies in paired serum breast milk samples in human strongyloidiasis. **Acta**  
35 **Tropica**, v.109, p.103-107, 2009.
- 36
- 37 NEGRÃO-CORRÊA, D. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective  
38 mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal  
39 mucosae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, p. 291-  
40 299, 2001.
- 41
- 42 NEILL, D. R.; WONG, S.H.; BELLOSI, A.; FLYNN, R.J.; DALY, M.; LANGFORD,  
43 T.K.A.; BUCKS, C.; KANE, C. M.; FALLON, P. G.; PANNELL, R.; JOLIN. H. E.;  
44 MCKENZIE, A. N. J. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that  
45 mediates type-2 immunity. **Nature**, v. 464, p. 1367-1370, 2010.

- 1 NILFOROUSHAN, M. R.; MIRHEND, H.; REZAIE, S.; REZAIAN, M.; MEAMAR, A.  
2 R.; KIA, E. B. A DNA-Based Identification of *Strongyloides stercoralis* Isolates from  
3 Iran. **Iranian Journal of Public Health**, v. 36, p. 16-20, 2007.
- 4 NOMURA, J.; REKRUT, K. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome in a  
5 patient with AIDS: diagnosis by fluorescent microscopy. **Clinical Infectious**  
6 **Diseases**, v. 22, p. 736, 1996.
- 7  
8 OLSEN, A.; VAN LIESHOUT, L.; MARTI, H.; POLDERMAN, T.; POLMAN, K.;  
9 STEINMANN, P.; STOTHARD, R.; THYBO, S.; VERWEIJ, J. J.; MAGNUSSEN, P.  
10 Strongyloidiasis – the most neglected of the neglected tropical diseases?  
11 **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p.  
12 967-972, 2009.
- 13  
14 ONAH, D. N.; NAWA, Y. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal  
15 nematodes. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 38, p. 209-236, 2000.
- 16  
17 ONUIGBO, M. A. C.; IBEACHUM, G. I. *Strongyloides stercoralis* larvae in peripheral  
18 blood. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**,  
19 v.85, p.97, 1991.
- 20  
21 ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Directrices: Quimioterapia  
22 preventiva para controlar las geohelmintiasis en grupos de población en riesgo.  
23 Ginebra, 2018.
- 24  
25 ORTIZ, D.; AFONSO, C.; HAGEL, I.; RODRIGUEZ, O.; ORTIZ, C.; PALENQUE, M.;  
26 LYNCH, N.R. Influencia de las infecciones helmínticas y estado nutricional em la  
27 respuesta inmunitaria de niños venezolanos. **Revista Panamericana de Salud**  
28 **Pública**, v. 8, p. 3-8, 2000.
- 29  
30 PAGE, W.; SPEARE, R. Chronic strongyloidiasis – don't look and you won't find.  
31 **Australian Family Physician**, v.45, n.1, p.40-44, 2016.
- 32  
33 PALAMIN, M. R. L. Funções da saliva para a cavidade oral: aspectos relacionados  
34 à mastigação, à deglutição e à fala. **Fonoatual**, v. 3, n. 8, p. 19-26, 1999.
- 35  
36 PAPPAS, M.G. Recent applications of the Dot-ELISA in immunoparasitology.  
37 **Veterinary Parasitology**, v. 29, p. 105-129, 1988.
- 38  
39 PAULA, F. M.; COSTA-CRUZ, J. M. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in  
40 Brazil. **Parasitology**, v. 138, p. 1331-1340, 2011.
- 41  
42 PAULA, F. M.; MALTA, F. M.; MARQUES, P. D.; SITTA, R. B.; PINHO, J. R. R.;  
43 GRYSCHKEK, R. C. B.; CHIEFFI, P. P. Molecular diagnosis of strongyloidiasis in  
44 tropical areas: a comparison of conventional and real-time polymerase chain  
45 reaction with parasitological methods. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p.  
46 272-274, 2015.

- 1 PAULA, F. M.; MALTA, F. M.; MARQUES, P. D.; MELO, G. B.; CORRAL, M. A.;  
2 GOTTARDI, M.; PINHO, J. R. R.; GONÇALVES, E. M. N.; CASTILHO, V. L. P.;  
3 PIERROTTI, L. C.; ABDALA, E.; COSTA, S. F.; CHIEFFI, P. P.; GRYSCHKEK, R. C.  
4 B. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* among transplant candidates.  
5 **Transplant Infectious Disease**, v. 20, e12909, 2018.
- 6  
7 PILLER, R. V. B. Epidemiologia da Tuberculose. **Pulmão**, v. 21, p. 4-9, 2012.
- 8  
9 PINHO, R. T.; PEDROSA, R. C.; COSTA-MARTINS, P.; CASTELLO-BRANCO, L.  
10 R. Saliva ELISA: a method for the diagnosis of chronic Chagas disease in endemic  
11 areas. **Acta Tropica**, v. 72, n. 1, p. 31-38, 1999.
- 12  
13 PIRES, M. L.; DREYER, G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*.  
14 **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v.  
15 48, p. 175-182, 1993.
- 16  
17 POTIAN, J. A.; RAFI, W.; BHATT, K.; McBride, A.; GAUSE, W. C.; SALGAME, P.  
18 Pre existing helminth infection induces inhibition of innate pulmonary anti-  
19 tuberculosis defense by engaging the IL-4 receptor pathway. **The Journal of**  
20 **Experimental Medicine**, v. 208, p. 1863-1874, 2011.
- 21  
22 PROBST, C.; FREULING, C.; MOSER, I.; GEUE, L.; KÖHLER, H.; CONRATHS,  
23 F.J.; HOTZEL, H.; LIEBLER-TENORIO, E.M.; KRAMER, M. Bovine tuberculosis:  
24 making a case for effective surveillance. **Epidemiology and Infection**, v.139, p.  
25 105-112, 2011.
- 26  
27 PUTHIYAKUNNON, S.; BODDU, S.; LI, Y.; ZHOU, X.; WANG, C.; LI, J.; CHEN, X.  
28 Strongyloidiasis - an insight into its global prevalence and management. **PLoS**  
29 **Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.8, p.e3018, 2014.
- 30  
31 PUTLAND, R. A.; THOMAS, S. M.; GROVE, D. I.; JOHNSON, A. M. Analysis of the  
32 18S ribosomal RNA gene of *Strongyloides stercoralis*. **International Journal for**  
33 **Parasitology**, v. 23, p. 149-151, 1993.
- 34  
35 RABAHI, M. F.; SILVA JÚNIOR, J. L. R.; FERREIRA, A. C. G.; TANNUS-SILVA, D.  
36 G. S.; CONDE, M. B. Tratamento da tuberculose. **Jornal Brasileiro de**  
37 **Pneumologia**, v. 43, p. 472-486, 2017.
- 38  
39 RAFI, W.; BHATT, K.; GAUSE, W. C.; SALGAME, P. Neither Primary nor Memory  
40 Immunity to *Mycobacterium tuberculosis* Infection Is Compromised in Mice with  
41 Chronic Enteric Helminth Infection. **Infection and Immunity**, v. 83, p. 1217-1223,  
42 2015.
- 43  
44 RAVI, V.; RAMACHANDRAN, S.; THOMPSON, R. W.; ANDERSEN, J. F.; NEVA, F.  
45 A. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from

- 1 *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. **Molecular and Biochemical**  
2 **Parasitology**, v. 125, p. 73-81, 2002.
- 3
- 4 REPETTO, S. A.; RUYBAL, P.; SOLANA, M. E.; LOPEZ, C.; BERINI, C. A.; ALBA  
5 SOTO, C. D.; CAPPA, S. M. Comparison between PCR and larvae visualization  
6 methods for diagnosis of *Strongyloides stercoralis* out of endemic area: a proposed  
7 algorithm. **Acta Tropica**, v. 157, p. 169–77, 2016.
- 8
- 9 REY, L. **Parasitologia**. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas  
10 e na África. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 581-590, 2001.
- 11
- 12 REZENDE, T. M. B.; VIEIRA, L.Q.; CARDOSO, F. P.; OLIVEIRA, R. R.; OLIVEIRA,  
13 M. S. T.; JORGE, M. L. R.; RIBEIRO SOBRINHO, A.P. The effect of mineral trioxide  
14 aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species  
15 and arginase activity by M1 and M2 macrophages. **International Endodontic**  
16 **Journal**, v. 40, p. 603-611, 2007.
- 17
- 18 RIBEIRO, V. S.; FELICIANO, N. D.; GONZAGA, H. T.; COSTA, I. N.;  
19 GONÇALVES-PIRES, M. R.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Detergent fraction  
20 of heterologous antigen to detect IgA and IgG in strongyloidiasis using saliva and  
21 serum paired samples. **Immunology Letters**, v. 134, p. 69-74, 2010.
- 22
- 23 RITCHIE, L. S. Ether sedimentation technique for routine stool examination.  
24 **Bulletin of the National Service of Army-Medical Department**, v. 8, p. 326-334,  
25 1948.
- 26
- 27 RODRIGUES R. M.; SILVA, N. M.; GONÇALVES, A. L. R.; CARDOSO, C. R.;  
28 ALVES, R.; GONÇALVES, F. A.; BELETTI, M. E.; UETA, M. T.; SILVA, J.; COSTA-  
29 CRUZ, J. M. Major histocompatibility complex (MHC) class II but not MHC class I  
30 molecules are required for efficient control of *Strongyloides venezuelensis* infection  
31 in mice, **Immunology**, v. 128, p. 432-441, 2009.
- 32
- 33 RODRIGUES, R. M.; DE OLIVEIRA, M. C.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A.;  
34 CAMPOS, D. M.; TAKETOMI, E. A.; COSTA-CRUZ, J. M. IgG1, IgG4, and IgE  
35 antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti*  
36 saline extract as heterologous antigen. **Parasitology Research**, v. 101 p. 1209-  
37 1214, 2007.
- 38
- 39 RODRIGUES, R. M.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A. O.; CUNHA - JUNIOR, J. P.;  
40 TAKETOMI, E. A.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides ratti* antigenic components  
41 recognized by IgE antibodies in immunoblotting as an additional tool for improving  
42 the immunodiagnosis in human strongyloidiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo**  
43 **Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 1, p. 89-93, 2004.
- 44
- 45 RODRIGUEZ, C. D.; IGUAL, A. R.; OLTRA, A. C.; SANCHEZ, S. P.;  
46 BUSTAMANTE, B. M.; PARRA, G. F.; NAGORE, E. E. Agricultural occupation in

- 1 strongyloidiasis. A case-control study. **Revista Clínica Espanhola**, v. 201, p. 81-  
2 84, 2001.
- 3
- 4 ROSSI, C. L.; TAKAHASHI, E. E.; PARTEL, C. D.; TEODORO, L. G. V. L.; SILVA,  
5 L. J. Total serum IgE and parasite-specific IgG and IgA antibodies in human  
6 strongyloidiasis. **Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, p.  
7 361-365, 1993.
- 8
- 9 RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de  
10 nematóides das fezes: modificações do método de Baermann. **Revista do**  
11 **Instituto Adolfo Lutz**, v. 14, p. 5-8, 1954.
- 12
- 13 SALGAME, P.; YAP, G. S.; GAUSE, W. C. Effect of helminth-induced immunity on  
14 infections with microbial pathogens. **Nature Immunology**, v. 14, p. 1118-1126,  
15 2013.
- 16
- 17 SAMPAIO, B. F. C.; MEIRELES, L. R.; ANDRADE JÚNIOR, H. F. Padronização da  
18 metodologia dot-ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- *Toxoplasma gondii*  
19 em saliva. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, p. 310-319, 2015.
- 20
- 21 SANCHEZ-MARTIN, JR.; CARDAS, J.; AHEDO, L.; FANO, E.; ECHEBARRIA, A.;  
22 AZPIROZ, A. Social behavior, cortisol, and sIgA levels in preschool children.  
23 **Journal of psychosomatic research**, v. 50, p. 221-227, 2001.
- 24
- 25 SANDERSON, I. R.; WALKER, W. A. Mucosal barrier. In: **Mucosal Immunology**.  
26 Academic Press, 1999.
- 27
- 28 SANDGREN, A.; HOLLO, V.; VAN DER WERF, M. J. Extrapulmonary tuberculosis  
29 in the European Union and European Economic Area, 2002 to 2011. **Euro**  
30 **Surveillance**, v. 18, p. 1-9, 2013.
- 31
- 32 SANTOS, M. M.; GARCIA, T. C.; ORSINI, M.; DISCH, J.; KATZ, N.; RABELLO A.  
33 Oral fluids for the immunodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection.  
34 **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p.  
35 289-292, 2000.
- 36 SATO, Y.; KOBAYASHI, J.; SHIROMA, Y. Serodiagnosis of strongyloidiasis. The  
37 application and significance. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São**  
38 **Paulo**, v. 37, p. 35-41, 1995.
- 39
- 40 SATO, Y.; TOMA, H. *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. **International**  
41 **Parasitology**, v. 20, p. 57-62, 1990.
- 42
- 43 SCHAFFEL, R.; NUCCI M.; CARVALHO, E.; BRAGA, M.; ALMEIDA, L.;  
44 PORTUGAL, R.; PULCHERI, W. The value of in immunoenzymatic test (Enzyme-

- 1 linked immunosorbent assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients  
2 immunosuppressed by hematologic malignancies. **American Journal of Tropical**  
3 **Medicine and Hygiene**, v. 65, p. 346-350, 2001.
- 4
- 5 SCHÄR, F.; TROSTDORF, U.; GIARDINA, F.; KHIEU, V.; MUTH, S.; MARTI2, H.;  
6 VOUNATSOU, P.; ODERMAT, P. *Strongyloides stercoralis*: Global Distribution and  
7 Risk Factors. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, e.2288, 2013.
- 8
- 9 SCRIBA, T. J.; KALSDORF, B.; ABRAHAMS, D. A.; ISAACS, F.; HOFMEISTER, J.;  
10 BLACK, G.; HASSAN, H. Y.; WILKINSON, R. J.; WALZL, G.; GELDERBLOEM, S.  
11 J.; MAHOMED, H.; HUSSEY, G. D.; HANEKOM, W. A. Distinct, specific IL-17- and  
12 IL-22-producing CD4<sup>+</sup> T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial  
13 immune response. **Journal of immunology**, v. 180, p. 1962-1970, 2008.
- 14
- 15 SHARIATI, F; PÉREZ-ARELLANO, J. L.; LÓPEZ-ABÁN, J.; EL BEHAIRY, A. M.;  
16 MURO, A. Role of angiogenic factors in acute experimental *Strongyloides*  
17 *venezuelensis* infection. **Parasite Immunology**, v. 32, p. 430-439, 2010.
- 18
- 19 SHARIFDINI, M.; MIRHENDI, H.; ASHRAFI, K.; HOSSEINI, M.; MOHEBALI, M.;  
20 KHODADADI, H.; KIA, E. B. Comparison of Nested Polymerase Chain Reaction  
21 and Real-Time Polymerase Chain Reaction with Parasitological Methods for  
22 Detection of *Strongyloides stercoralis* in Human Fecal Samples. **The American**  
23 **journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, p. 1285-1291, 2015.
- 24
- 25 SHIWAKU, K.; CHIGUSA, Y.; KADOSAKA, T.; KANEKO, K. Factors influencing  
26 development of free-living generations of *Strongyloides stercoralis*. **Parasitology**, v.  
27 38, p. 129-138, 1988.
- 28
- 29 SIDDIQUI, A. A.; BERCK S. L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection.  
30 **Clinical Infection Diseases**, v. 33, p. 1040-1047, 2001.
- 31
- 32 SILVA, A. T. P.; MONTEIRO, S. G.; FIGUEIREDO, P. M. S. Perfil epidemiológico  
33 dos pacientes portadores de tuberculose extrapulmonar atendidos em hospital da  
34 rede pública no Estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Clínicas Médicas**, v.  
35 9, n. 1, p. 11-14, 2011.
- 36
- 37 SILVA, H.; VICTAL DE CARVALHO, C. J.; MARCELO ARANTES LEVENHAGEN,  
38 M.A.; COSTA-CRUZ, J. M. The detergentfraction is effective in the detection of IgG  
39 anti-*Strongyloides stercoralis* in sérum samples from immunocompromised  
individuals. **Parasitology International**, v. 63, p. 790-793, 2014.
- 40
- 41 SILVA, L. P.; BARCELOS, I. S.; PASSOS-LIMA, A. B.; ESPINDOLA, F. S.;  
42 CAMPOS, D. M.; COSTA-CRUZ, J. M.; Western blotting using *Strongyloides ratti*  
43 antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human  
44 strongyloidiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 687-691, 2003.

- 1 SINGH, K.; CHANG, C.; GERSHWIN, E. M. IgA deficiency and autoimmunity.  
2 **Autoimmunity Reviews**, v. 13, p. 163-177, 2014.
- 3 SITTA, R. B.; MALTA, F. M.; PINHO, J. R.; CHIEFFI, P. P.; GRYSHECK, R. C. B.;  
4 PAULA, F. M. Conventional PCR for molecular diagnosis of human strongyloidiasis.  
5 **Parasitology**, v. 141, p. 1-6, 2014.
- 6 SMITH, A. M. V.; BOWEN, W. H. In situ studies of pellicle formation on  
7 hydroxyapatite discs. **Archives of Oral Biology**, v. 45, n. 4, p. 277-291, 2000.
- 8 SRIVASTAVA, S.; ERNST, J. D. Cell to cell transfer of *M. tuberculosis* antigens opti-  
9 mizes CD4T cell priming. **Cell Host Microbe**, v. 15, p. 741-752, 2014.
- 10 STEINMAN, L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2  
11 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nature Medicine**, v. 13, p. 139-145,  
12 2007.
- 13  
14 STEINMANN, P.; ZHOU, X. N.; DU, Z. W.; JIANG, J. Y.; WANG, L. B.; WANG, X.  
15 Z.; LI, L. H.; MARTI, H.; UTZINGER, J. Occurrence of *Strongyloides stercoralis* in  
16 Yunnan Province, China, and comparison of diagnostic methods. **PLOS Neglected**  
17 **Tropical Diseases**, v. 1, e75, 2007.
- 18  
19 SUDRÉ, A. P.; MACEDO, H. W.; PERALTA, R. H. S.; PERALTA, J. M. Diagnóstico  
20 da estrogiloidíase humana: importância e técnicas. **Revista de Patologia**  
21 **Tropical**, v. 35, p. 174-184, 2006.
- 22  
23 SUDRÉ, A. P.; SIQUEIRA, R. C.; BARRETO, M. G.; PERALTA, R. H.; MACEDO H.  
24 W.; PERALTA, J. M. Identification of a 26-kDa protein fraction as an  
25 important antigen for application in the immunodiagnosis of strongyloidiasis.  
26 **Parasitology Research**, v. 101, p. 1117-1123, 2007.
- 27  
28 SPITS, H.; ARTIS, D.; COLONNA, M.; DIFENBACH, A.; DI SANTO, J. P.; EBERL,  
29 G.; KOYASU, S.; LOCKSLEY, R. M.; MCKENZIE, A. N.; MEBIUS, R. E.; POWRIE,  
30 F.; VIVIER, E. Innate lymphoid cells - a proposal for uniform nomenclature. **Nature**  
31 **Reviews. Immunology**, v. 13, p. 145-149, 2013.
- 32  
33 TAKAYANAGUI, O. M.; LOFRANO, M. D.; ARAÚJO, M. D.; CHIMELLI, M. D.  
34 Detection of *Strongyloides stercoralis* in the cerebrospinal fluid of a patient with  
35 acquired immunodeficiency syndrome. **Neurology**, v. 45, p. 193-194, 1995.
- 36  
37 TEGEGNE, Y.; WONDMAGEGN, T.; WORKU, L.; ZELEKE, A. J. Prevalence of  
38 Intestinal Parasites and Associated Factors among Pulmonary Tuberculosis  
39 Suspected Patients Attending University of Gondar Hospital, Gondar, Northwest  
40 Ethiopia. **Journal of Parasitology Research**, v. 15, e9372145, 2018.

- 1 TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da  
2 tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **Jornal Brasileiro de**  
3 **Pneumonia**, v. 33, p. 323-334, 2007.
- 4 TEN HOVE, R. J.; VAN ESBROECK, M.; VERVOORT, T.; van den ENDE, J.; van  
5 LIESHOUT, L.; VERWEIJ, J. J. Molecular diagnostics of intestinal parasites in  
6 returning travelers. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious**  
7 **Diseases**, v. 28, p. 1045-1053, 2009.
- 8  
9 TOLEDO, M. J. O.; PALUDETTO, A. W.; MOURA, F. T.; NASCIMENTO, E. S.;  
10 CHAVES, M.; ARAUJO, S. M.; MOTA, L. T. Avaliação de atividades de controle  
11 para enteroparasitoses em aldeia Kaingáng do Paraná. **Revista de Saúde Pública**,  
12 v. 43, p. 981-990, 2009.
- 13  
14 TOLEDO, R.; MUÑOZ-ANTOLI, C.; ESTEBAN, J. G. Strongyloidiasis with emphasis  
15 on human infections and its different clinical forms. **Advances in Parasitology**,  
16 v.88, p.165-241, 2015.
- 17  
18 TRAJMAN, A.; MacDONALD, T. T.; ELIA, C. C. S. Intestinal immune cells in  
19 *Strongyloides stercoralis* infection. **Journal of Clinical Pathologic**, v. 50, p. 991-  
20 995, 1997.
- 21  
22 TRISTÃO-SÁ, R.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; JOHNSON, L.T.; PEREIRA, F. E. L.;  
23 DIETZE, R. Intestinal nematodes and pulmonar tuberculosis. **Revista da**  
24 **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 533-535, 2002.
- 25  
26 UMEMURA, M.; YAHAGI, A.; HAMADA, S.; BEGUM, D.; WATANABE, H.;  
27 KAWAKAMI, K.; SUDA, T.; SUDO, K.; NAKAE, S.; IWAKURA, Y.; MATSUZAKI, G.  
28 IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against  
29 pulmonar *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin infection. **Journal of**  
30 **Immunology**, v. 178, p. 3786-3796, 2007.
- 31  
32 UPARANUKRAW, P.; PHONGSRI, S.; MARAKOTE, N. Fluctuations of larval  
33 excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. **American Journal of Tropical**  
34 **Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 967-973, 1999.
- 35  
36 VERDONCK, K.; GONZALÉZ, E.; VAN DOOREN, S.; VANDAMME, A.M.;  
37 VANHAM, G.; GOTUZZO, E. Human T-lymphotropic vírus 1: recent knowledge  
38 about na ancient infection. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, p. 266-281, 2007.
- 39  
40 VERWEIJ, J. J.; STENSVOLD, C. R. Molecular testing for clinical diagnosis and  
41 epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clinical microbiology*  
42 *review*, v. 27, p. 371–418, 2014.
- 43  
44 VERWEIJ, J. J.; CANALES, M.; POLMAN, K.; ZIEM, J.; BRIENEN, E. A.;  
45 POLDERMAN, A.M.; VAN LIESHOUT, L. Molecular diagnosis of *Strongyloides*

1 *stercoralis* in fecal samples using real-time PCR. **Transactions of the Royal**  
2 **Society of Tropical Medicine**, v.103, p. 342-346, 2009.

3  
4 WEINER, H. L. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune  
5 diseases. **Immunology Today**, v. 18, p. 335-343,1997.

6  
7 WENMAN, W. M. Human immune response to *Giardia lamblia* infection. **The**  
8 **Journal of Infectious Diseases**, v. 155, p. 137-140, 1987.

9  
10 WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen  
11 majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United**  
12 **States of America**, v. 95, n. 12, p. 6578-6583, 1998.

13  
14 WHO - World Health Organization 2017. Bending the curve: ending TB. Annual  
15 report 2017. **WHO, Geneva**, p. 1-76, 2017.

16  
17 WOOF, J. M.; KERR, M. A. The function of Immunoglobulin A in immunity. **The**  
18 **Journal of Pathology**, v. 82. p. 208-270, 2006.

19  
20 YAMAGUTI, S. The nematodes of vertebrates. System Helminthum. **Interscience**  
21 **Publishers**, v. 3, part I and II, 1961.

22  
23 YORI, P. P.; KOSEK, M.; GILMAN, R. H.; CORDOVA, J.; BERN, C.; CHAVEZ, C.  
24 B.; OLORTEGUI, M. P.; MONTALVAN, C., SANCHEZ, G. M.; WORTHEN, J.;  
25 LEUNG, F.; ORE, C. V. Seroepidemiology of strongyloidiasis in the peruvian  
26 amazon. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, p. 97-  
27 102, 2006.

28  
29 YOSHIDA, Y. O.; UMEMURA, M.; YAHAGI, A.; O'BRIEN, R. L.; IKUTA, K.;  
30 KISHIHARA, K.; HARA, H.; NAKAE, S.; IWAKURA, Y.; MATSUZAKI, G. Essential  
31 role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the  
32 lung. **Journal of Immunology**, v.184, p. 4414-4422, 2010.

33  
34 ZAHA, Ó; HIRATA, T; KINJO, F; SAITO, UM; FUKUHARA, H. Efficacy of ivermectin  
35 for chronic strongyloidiasis: two single doses given 2 weeks apart. **Journal of**  
36 **Infection and Chemotherapy**, Tokio, v. 8, n. 1, p. 94-98, 2002.

1 **4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA**

2

3 **4.1. ARTIGO 1**

4 **Immune complex detection in saliva samples: an innovative proposal for the**  
5 **diagnosis of human strongyloidiasis**

6

7 Larissa Rodrigues Bosqui, Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves, Maria do Rosário de  
8 Fátima Gonçalves-Pires, Wander Rogério Pavanelli, Ivete Conchon-Costa, Julia  
9 Maria Costa-Cruz, Idessania Nazareth Costa.

10

11

12

13

14

15

16

17

18 **Parasitology, 2018**

19

20 QUALIS: A2

21

22 F.I: 2.511

23

24 Volume 145(8): Páginas 1090-1094.

25

26 [doi.org/10.1017/S0031182017002232](https://doi.org/10.1017/S0031182017002232)

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

## Research Article

**Cite this article:** Bosqui LR, Gonçalves ALR, Gonçalves-Pires MRF, Pavaneli WR, Conchon-Costa I, Costa-Cruz JM, Costa IN. Immune complex detection in saliva samples: an innovative proposal for the diagnosis of human strongyloidiasis. *Parasitology* <https://doi.org/10.1017/S0031182017002232>

Received: 3 August 2017

Revised: 6 October 2017

Accepted: 27 October 2017

**Key words:**

Human strongyloidiasis; immunodiagnostic; immune complex; saliva

**Author for correspondence:**

Idessalvia Nazareth da Costa, Email: [idesw@ig@hotmail.com](mailto:idesw@ig@hotmail.com)

## Immune complex detection in saliva samples: an innovative proposal for the diagnosis of human strongyloidiasis

L. R. Bosqui<sup>1</sup>, A. L. R. Gonçalves<sup>2</sup>, M. R. F. Gonçalves-Pires<sup>2</sup>, W. R. Pavaneli<sup>1</sup>, I. Conchon-Costa<sup>1</sup>, J. M. Costa-Cruz<sup>2</sup> and I. N. Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Patológicas, Laboratório de Parasitologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina PR, Brazil and <sup>2</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia MG, Brazil

**Abstract**

Human strongyloidiasis is caused by helminth *Strongyloides stercoralis*. It has a worldwide distribution, often neglected and cause of severe morbidity. The parasitological diagnosis is hindered by the low and irregular amount of larvae in feces. The goal of the present study was to detect IgG and IgG immune complex using conventional serum samples and saliva as alternative samples. We collected samples from 60 individuals, namely: group I composed of 30 healthy individuals; and group II composed of 30 individuals eliminating *S. stercoralis* larvae in feces. We calculated the area under the curve, general index of diagnostic accuracy, Kappa index and determined the correlations between different diagnostic tests. The detection of IgG levels was performed by an immunoenzymatic assay with alkaline extract of *S. venezuelensis* larvae as antigen. Positivity of anti-*S. stercoralis* IgG in serum samples from group I was 3.3%, and from group II 93.3%. The detection of immune complex indicated that group I exhibited 3.3% and group II 56.7%. In the saliva samples, IgG detection was 26.7% for group I and 43.3% for group II. Immune complex was detected in 20% of group I, and 30% of group II. IgG immune complex in conventional serum samples and saliva as alternative samples can be considered biomarkers for the diagnosis of active strongyloidiasis.

**Introduction**

Strongyloidiasis is an infection caused by helminth *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1876) and considered to be neglected. It has heterogeneous worldwide distribution, mainly in tropical and subtropical regions (Olsen *et al.* 2009; Paula and Costa-Cruz, 2011). Usually, strongyloidiasis evolves in an asymptomatic manner; however, in some cases, the presence of eggs, larvae and adult parasites in the mucosa of the small intestine can result in inflammatory reaction, malabsorption syndrome and, consequently, chronic diarrhoea with protein loss, abdominal pain and bleeding with development of hypoalbuminemia and anaemia (Grove, 1996; Fardet *et al.* 2007). In addition, in immunocompromised individuals, extra intestinal manifestations can promote severe clinical conditions, such as hyperinfection and potentially fatal conditions, such as disseminated infection (Da Silva *et al.* 2014; Levenhagen and Costa-Cruz, 2014). These clinical conditions can cause mortality ranging from 15 to 87% when the disease is not diagnosed early (Agrawal *et al.* 2009).

The diagnosis of strongyloidiasis is based on the identification of larvae in fecal samples. However, the parasitological diagnosis becomes complex due to the low and irregular amount of larvae released in feces (Uparamakraw *et al.* 1999; Schär *et al.* 2013; Mendes *et al.* 2017). In order to assist the parasitological diagnosis, immunological tests such as immunoenzymatic assay (ELISA) are indicated for the diagnosis of human strongyloidiasis due to their high sensitivity. These tests are considered useful in serological screening (Gonzaga *et al.* 2011; Gonçalves *et al.* 2012; Bosqui *et al.* 2015).

In addition to the use of conventional serum samples for immunological diagnosis of human strongyloidiasis, the recent years have been characterized by the gradual increase in the number of studies on specific salivary antibodies as biomarkers in epidemiology and toxicology (Kaufman and Lanster, 2002; Ribeiro *et al.* 2010). They represent an alternative tool in the diagnosis of different protozoa (Del Muro *et al.* 1990; Loyola *et al.* 1997; Pinto *et al.* 1999; Borges and Figueiredo, 2004) and also human strongyloidiasis (Costa *et al.* 2003; Ribeiro *et al.* 2010; Bosqui *et al.* 2015). These studies have pointed out saliva as an alternative tool for assessing specific antibodies for diagnosis.

Infectious diseases result not only in the production of antibodies but also imply the formation of antigen-antibody complexes. These immune complexes are important because they bind to the phagocytic cells, where they are destroyed and eliminated. Moreover, they can be used as biomarkers in the course of the disease (Frank and Hester, 2009; De Carvalho *et al.* 2013). Therefore, the detection of antibodies and immune complexes through immunological assays contributes to the diagnosis in humans, especially when there is a high risk of developing severe forms of the disease (Gonçalves *et al.* 2016). In this context, the detection of

© Cambridge University Press 2017

CAMBRIDGE  
UNIVERSITY PRESS

immune complexes using saliva samples represents an innovative proposal for the diagnosis of strongyloidiasis in order to observe active forms of the disease.

Considering the severity of disseminated strongyloidiasis and the importance of identifying active infections, the present study proposes the detection of IgG immune complexes in the diagnosis of strongyloidiasis using conventional serum samples and alternative saliva samples. The procedure is carried out with the ELISA method using alkaline extracts of *S. venezuelensis* larvae as heterologous antigen. These are innovative approaches for the diagnosis of this potentially fatal infection when not detected and treated early in some cases.

#### Method

##### Subjects

Biological specimens were collected from 60 individuals divided into two groups: Group I: 30 apparently healthy individuals based on their clinical observation, without evidence of contact with *S. stercoralis* infection, no previous history of strongyloidiasis and three fecal samples tested negative. Group II: 30 patients attending the outpatient departments or admitted to the Clinical Hospital of the State University of Londrina, Paraná state, Brazil, harbouring *S. stercoralis* larvae, coprologically detected.

The study received approval from the Research Ethics Committee of the Universidade Estadual de Londrina, Paraná state, Brazil, nº 1494/2013-56.

##### Serum and saliva samples

Feces, blood and saliva samples were collected from all subjects. Three fecal samples were analysed according to Hoffmann *et al.* (1934) and Rugai *et al.* (1954). Serum was separated from blood and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. Unstimulated whole saliva samples were collected by using clean cotton swabs after washing oral cavity with water; distributed in aliquots and conserved until use; slowly thawed and centrifuged at 12 400 g for 15 min.

##### Parasites

Infective third stage larvae (L3) of *Strongyloides venezuelensis* were obtained from cultures of rat feces from *Rattus norvegicus* (Wistar). The cultures were stored at  $28^{\circ}\text{C}$  for 48 h, the infective larvae were collected and concentrated using the method of Rugai *et al.* (1954). The number of larvae recovered was washed 5 times with phosphate buffered saline (PBS,  $0.01\text{ mol L}^{-1}$ , pH 7.2) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in PBS until use.

##### Alkaline extract from *S. venezuelensis*

To alkaline extracts were prepared according to Machado *et al.* (2003) 1 mL of  $0.15\text{ mol L}^{-1}$  NaOH was added to 300 000 *S. venezuelensis* larvae and kept under gentle shaking for 6 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . Subsequently,  $0.3\text{ mol L}^{-1}$  HCl was added until a pH of 7.0 was reached. These preparations were then centrifuged at 12 400 g for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatants (alkaline extracts) were analysed for protein content according to Lowry *et al.* (1951), subdivided into aliquots and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

##### IgG-specific measurement in serum and saliva samples by ELISA

Preliminary experiments were carried out in order to determine the optimal conditions for ELISA through block titration of

reagents (antigens, control serum and saliva samples, and conjugate). Briefly, polystyrene microplates (BioAgency Laboratories, São Paulo, Brazil) were coated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with  $5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  of *S. venezuelensis* larvae (L3), in  $0.06\text{ mol L}^{-1}$  carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6). Plates were washed 3 times with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBST). After washing, plates were incubated with serum sample ( $50\text{ }\mu\text{L well}^{-1}$ ) with dilution 1:80 (for IgG detection) and incubated with saliva sample  $50\text{ }\mu\text{L well}^{-1}$  1:20 (for IgG detection) for 45 min at  $37^{\circ}\text{C}$  and subsequently with the secondary antibody consisting of peroxidase-labelled goat anti-human IgG conjugate (Sigma, St Louis, MO, USA) at the ideal dilution of 1:2000 for 45 min at  $37^{\circ}\text{C}$  in low affinity plate for sera and high affinity plate in saliva. The reagents were used for a final assay volume of  $50\text{ }\mu\text{L well}^{-1}$ . The reaction was revealed by adding the enzyme substrate ( $5\text{ }\mu\text{L } 30\% \text{ H}_2\text{O}_2$  Merck (Darmstadt, Germany) and  $5\text{ mg o-phenylenediamine}$  [OPD] in  $12.5\text{ mL}$  of  $0.1\text{ M}$  citrate-phosphate buffer, pH 5.0) and incubation for 15 min at room temperature. Optical densities (OD) were determined at 492 nm in an ELISA reader (Titertek Plus, Flow Laboratories, USA).

##### Measurement of immune complex in serum and saliva samples

Preliminary experiments were carried out in order to determine the optimal conditions for ELISA through serial dilution of the reagents (antibody, control serum and saliva, and conjugate). Polystyrene microtitre plates were coated for 18 h at  $4^{\circ}\text{C}$  with  $50\text{ }\mu\text{L well}^{-1}$  of IgG obtained from immunized rabbits ( $40\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Gonçalves *et al.* 2010) in  $0.06\text{ M}$  carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6). After three washes with PBST,  $50\text{ }\mu\text{L well}^{-1}$  of serum samples (1:80) or saliva (pure) were added and incubated for 45 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . Positive and negative serum and saliva samples to the immune complex were used as a control. The positive serum and saliva samples consisted of a positive sample for IgG anti-*S. venezuelensis*. After incubation for 45 min at  $37^{\circ}\text{C}$  and another three washes, the peroxidase-labelled goat anti-human IgG (Sigma, St Louis, MO, USA) was added ( $50\text{ }\mu\text{L well}^{-1}$ ) at the ideal dilution of 1:2000 for 45 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . The reaction was revealed by adding the enzyme substrate ( $5\text{ }\mu\text{L } 30\% \text{ H}_2\text{O}_2$  Merck (Darmstadt, Germany) and  $5\text{ mg o-phenylenediamine}$  [OPD] in  $12.5\text{ mL}$  of  $0.1\text{ M}$  citrate-phosphate buffer, pH 5.0) and incubation for 15 min at room temperature.

##### Statistical analysis

Analyses were performed using the GraphPad software package version 5.0. Optimum point for each condition of ELISA reaction and cut-off points were established using a 2-graph receiver operating characteristic curve (TG-ROC) combined with a ROC curve (Greiner *et al.* 1995). ELISA index (EI) was obtained by the ratio between OD and cut-off. Values of EI greater than the optimum point of reaction for each extract were considered positive. ROC curves were built to describe test indexes (Martinez *et al.* 2003). The area under the ROC curve (AUC), an index of diagnostic accuracy, was calculated and values close to 1 indicate an informative test and values close to 0.5 indicate an uninformative test (Harley and McNeil, 1982). Likelihood ratio, which indicates how likely patients with strongyloidiasis are going to have a specified test detection compared with patients not infected by the parasite, was estimated as  $\text{Se}/(1 - \text{Sp})$ . Correlations between levels of different diagnostic tests in each sample tested with *S. stercoralis* were determined using Spearman ( $r$ ) or Spearman rank test ( $r_s$ ). The concordance of the results obtained between the serum and saliva samples was carried out analysis of Kappa

coefficient ( $\alpha$ ) (Landis and Koch, 1977). Probability ( $P$ ) values of  $<0.05$  were regarded as significant.

### Results

The detection of IgG antibodies and immune complexes in serum and saliva samples is illustrated in Fig. 1. The positivity rate of anti-*S. stercoralis* IgG in serum samples of individuals with negative parasitological results (Group I) was 3.3% ( $n=1$ ), whereas in individuals harbouring *S. stercoralis* larvae (copropositive) (Group II) was of 93.3% ( $n=28$ ). Regarding the detection of immune complexes in serum samples, positivity in group I was 3.3% ( $n=1$ ), whereas in group II it was 56.7% ( $n=17$ ) (Fig. 1A). The analysis of saliva samples for anti-*S. stercoralis* IgG indicated positivity of 26.7% ( $n=8$ ) in group I and 43.3% ( $n=13$ ) in group II. The detection levels of immune complexes in saliva samples were 20% ( $n=6$ ) for group I and 30% ( $n=9$ ) for group II (Fig. 1B).

In order to observe the correlation between the results, we quantified the combination of data between human IgG antibodies and immune complexes in serum and saliva samples (Fig. 2). Figure 2A and C illustrate the diagnostic correlation between serum and saliva samples from the group with a positive coparasiological diagnosis for *S. stercoralis*, respectively. Figure 2A shows that the correlation between the results was weak ( $r=0.25$ ;  $P>0.05$ ), whereas Fig. 2C shows that the correlation was significantly positive ( $r=1$ ;  $P<0.05$ ). On the other

hand, positive correlation of the results obtained in the analysis of serum and saliva samples from the group of healthy individuals (Fig. 2B and D, respectively) can only be observed in Fig. 2D ( $r=0.53$ ;  $P<0.05$ ). This study showed excellent agreement in the detection of IgG ( $\alpha=0.90$ ) and moderate for IC ( $\alpha=0.51$ ) in serum.

### Discussion

Currently, immunological diagnosis of strongyloidiasis is mainly performed detecting IgG antibodies, given that there is a predominance of a humoral response (Atkins *et al.* 1997; Bosqui *et al.* 2015).

In our study, it was possible to observe 93.3% of positive cases for IgG in serum samples. IgG antibodies are the largest class of serum immunoglobulins able to provide protective immunity and remain for a long period of time after the cure of the disease (Carvalho *et al.* 1983; Iriemenam *et al.* 2010). In part, these characteristics are responsible for the success and advantages of the diagnosis of strongyloidiasis by means of detecting this class of antibodies in serum samples from infected individuals (Agrawal *et al.* 2009; Ribeiro *et al.* 2010; Bosqui *et al.* 2015). However, the high concentration of circulating antibodies and antigens in serum can result in the formation of immune complexes (Ohya *et al.* 2016).

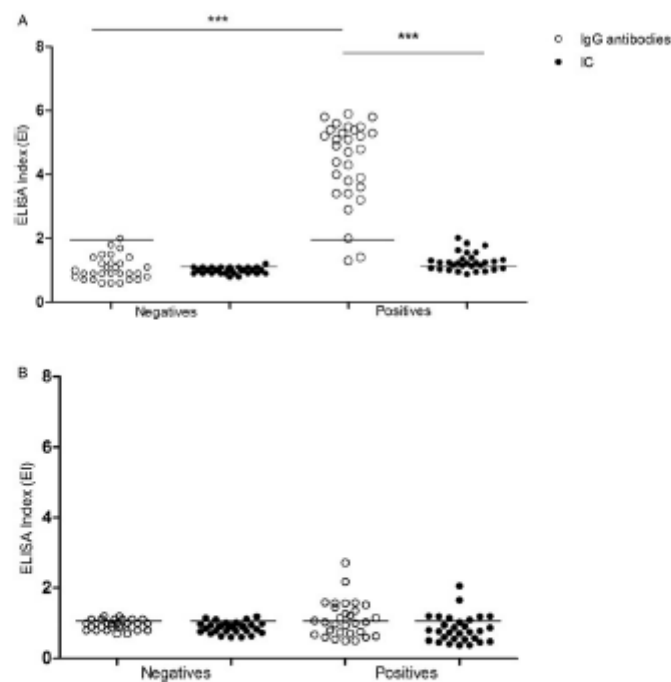
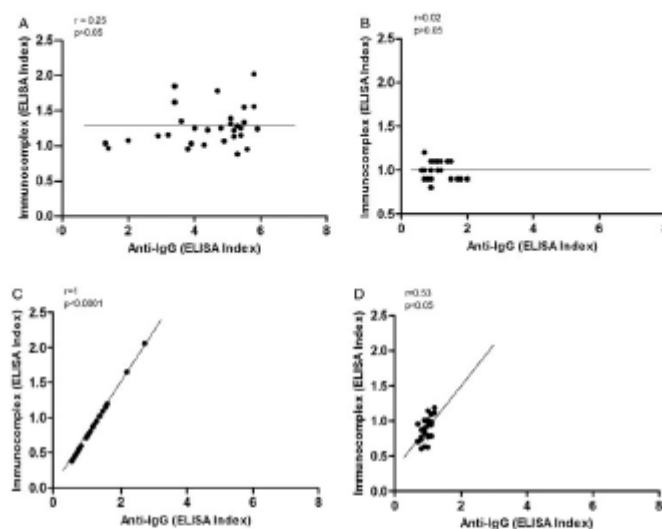


Fig. 1. IgG and immune complex anti-*S. stercoralis* in serum and saliva samples determined by immunoenzymatic assay using alkaline extract of *S. stercoralis* L3 expressed in E6. The groups were divided into negative (control, apparently healthy individuals (Group I;  $n=30$ )) and individuals harbouring *S. stercoralis* larvae (copropositive) (Group II;  $n=30$ ). (A) Detection of IgG and immune complexes in serum samples from the two groups. (B) Detection of IgG and immune complexes in saliva samples from the two groups. The dashed line represents the threshold for positivity ( $EI=1.0$ ); \*\*\* $P<0.001$ . EI, ELISA Index.



**Fig. 2.** Use of the correlation between human anti-IgG and immune complexes in paired samples for diagnosis. (A) and (C): correlation between circulating antibodies and antibodies complexed to antigen in serum and saliva samples, respectively, in patients with positive copro-parasitological diagnosis for *S. stercoralis*; (B) and (D): correlation between circulating antibodies and antibodies complexed to antigen in serum and saliva samples, respectively, in patients with negative copro-parasitological diagnosis for *S. stercoralis*.

Our study revealed that the detection of circulating IgG immune complexes in serum was significant (70%). Immune complexes play an important role in neutralizing the pathogenesis of the disease, being rapidly eliminated from the bloodstream by the innate immune system. In addition, circulating immune complexes have been reported with increased frequency in parasitic diseases (Ohyama *et al.* 2016).

Our assay proved to be effective in the detection of IgG anti-*Strongyloides* spp., both in serum and saliva samples, showing acceptable levels of reliability and being able to minimize false positive results. The same result can be observed in different diagnoses, both experimental and in humans, given that the detection of immune complexes has also been used and the results were promising (Patil *et al.* 1996; Nezhin, 2009; Madhusudana *et al.* 2014; Gonçalves *et al.* 2016; Ohyama *et al.* 2016).

The few positive cases for detecting immunocomplex in the negative group can be explained by the persistence of IgG in an undiagnosed infection due to low release of larvae in feces and/or individuals with prior exposure living in areas with high prevalence of strongyloidiasis (Santos *et al.* 2007; Iriemenam *et al.* 2010; Ahmad *et al.* 2013).

The choice of an appropriate immunological method that complements the parasitological diagnosis is essential for an accurate estimate of strongyloidiasis. Therefore, detecting the levels of circulating immune complexes by an immunoenzymatic assay can be used as complementary screening in the diagnosis of strongyloidiasis. Immune complexes have an important participation in the physiopathology of the disease and, therefore, may reflect the immune response exerted by each individual, thus facilitating the control of this infection (Gonzaga *et al.* 2011; Gonçalves *et al.* 2012).

In addition to the use of serum samples for the immunological diagnosis of strongyloidiasis, saliva samples have been investigated in recent years as an alternative tool. These samples offer

advantages such as easy obtainment, noninvasive sampling and low cost, playing an important role in the local and systemic assessment of the immune response against the parasite (Costa *et al.* 2003; Ribeiro *et al.* 2010; Bosqui *et al.* 2015).

The analysis of saliva samples has become important to assess physiological and pathological conditions in humans (Sawangsotha *et al.* 2012). This is a pioneering study assessing patients with strongyloidiasis and presents an innovative proposal for using saliva samples to detect immune complexes.

#### Concluding remarks

In conclusion, the detection of IgG immune complexes in conventional serum samples and saliva the alternative samples can be considered a promising strategy for the diagnosis of active strongyloidiasis.

**Acknowledgement.** We acknowledge the patients and volunteers who agreed to participate in this study.

**Financial Support.** This study was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Grant No. 40002012026M9 (L.R.B.) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG – Grant No. CBB-PPM-00396-13) (J.M.C.C.).

**Conflict of Interest.** The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### References

- Agrawal V, Agrawal T and Ghoshal UC (2009) Intestinal strongyloidiasis: a diagnosis frequently missed in the tropics. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103, 242–246.
- Ahmad AF, Hadip F, Ngai R, Lim YAL and Mahmud R (2013) Serological and molecular detection of *Strongyloides stercoralis* infection among an Orang Asli community in Malaysia. *Parasitology Research* 112, 2811–2816.

- Akins NS, Lindo JF, Lee MG, Conway DJ, Bailey JW, Robinson RD and Bundy DAP (1997) Humoral responses in human strongyloidiasis: correlations with infection chronicity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 91, 609–613.
- Bavay A. (1876) Sur l'Anquililule stercorale: (Presentée par M.P. Gervais) C.R. *Hébd. Séances Académie des sciences* 83, 694–696.
- Borges AS and Figueiredo JFC (2004) Detection of anti-*Trichostrongylus axei* IgG, IgM and IgA immunoglobulins in the serum, cerebrospinal fluid and saliva of patients with acquired immunodeficiency syndrome and neurostrongyloidiasis. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 62, 1033–1037.
- Bosqui LR, Gonçalves AL, Gonçalves-Pires M do R, Custódio LA, de Menezes MC, Murad VA, de Paula FM, Pavanelli WR, Conchon-Gosta I, Costa-Cruz JM and Costa IN (2015) Detection of parasite-specific IgG and IgA in paired serum and saliva samples for diagnosis of human strongyloidiasis in northern Paraná state, Brazil. *Acta Tropica* 150, 190–195.
- Carvalho EM, Andrade TM, Andrade JA and Rocha H (1983) Immunological features in different clinical forms of strongyloidiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 346–349.
- Costa IN, Sopedete MC, Gonçalves-Pires MRF and Costa-Cruz JM (2003) IgA and IgG antibodies in paired serum and saliva samples in human strongyloidiasis. *Acta Parasitologica* 48, 306–311.
- Da Silva H, de Carvalho CJ, Levenhagen MA and Costa-Cruz JM (2014) The detergent fraction is effective in the detection of IgG anti-*Strongyloides stercoralis* in serum samples from immunocompromised individuals. *Parasitology International* 63, 790–793.
- De Carvalho C, Partata A, Hiramoto R, Borborema S, Meimles L, Nascimento N and de Andrade H Jr (2013) A simple immune complex dissociation ELISA for leishmaniasis: standardization of the assay in experimental models and preliminary results in canine and human samples. *Acta Tropica* 125, 128–136.
- Del Mono R, Acosta E, Meñero E, Glender W and Ortiz-Ortiz I. (1990) Diagnosis of intestinal amoebiasis using salivary IgA antibody detection. *The Journal of Infectious Disease* 162, 1360–1364.
- Fardet I, Générat T, Poirat J, Guidet B, Kettaneh A and Cahane J (2007) Severe strongyloidiasis in corticoid steroid-treated patients: case series and literature review. *Journal of Infection* 54, 18–27.
- Frank MM and Heier CG (2009) Immune complexes: normal physiology and role in disease. *Allergy Frontiers: Classification and Pathomechanisms* 2, 79–94.
- Gonçalves AL, Rodrigues RM, Ueta MT and Costa-Cruz JM (2010) Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 67, 153–161.
- Gonçalves AL, de Araújo KC, Carvalho EF, Ueta MT and Costa-Cruz JM (2016) Specific IgG and immune complex responses to parthenogenetic females and eggs of nematode *Strongyloides venezuelensis* for the diagnosis of immunosuppression in infected rats. *Journal of Helminthology* 90, 342–346.
- Gonçalves ALR, Nunes DS, Gonçalves-Pires MRF, Ueta MT and Costa-Cruz JM (2012) Use of larval, parasitic female and egg antigens from *Strongyloides venezuelensis* to detect parasite-specific IgG and immune complexes in immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Parasitology* 139, 956–961.
- Gonaga HT, Ribeiro VS, Feliciano ND, Manhani MN, Silva DA, Ueta MT and Costa-Cruz JM (2011) IgG avidity in differential serodiagnosis of human strongyloidiasis active infection. *Immunology Letters* 139, 87–92.
- Grünler M, Söhr D and Göbel P (1995) A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *Journal of Immunological Methods* 185, 123–132.
- Grove DI (1996) Human strongyloidiasis. *Advances in Parasitology* 38, 251–309.
- Hanley JA and McNeil BJ (1982) The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 143, 29–36.
- Hoffmann WA, Pons JA and Janer JL (1934) The sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*, Puerto Rico. *The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine* 9, 283–291.
- Iriemena NC, Sanyalu AO, Oyiho WA and Fagbenro-Beyioku AF (2010) *Strongyloides stercoralis* and the immune response. *Parasitology International* 59, 9–14.
- Kaufman E and Lamster IB (2002) Analysis of saliva for periodontal diagnosis – a review. *Journal of Clinical Periodontology* 27, 453–465.
- Landis JR and Koch GG (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159–174.
- Levenhagen MA and Costa-Cruz JM (2014) Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. *Acta Tropica* 135, 33–43.
- Lovely OH, Basebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 29, 265–275.
- Loyola AM, Durighetto AFJR, Silva DA and Mineo JR (1997) Anti-*Trichostrongylus axei* immunoglobulins A and G in human saliva and serum. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 26, 187–191.
- Machado ER, Ueta MT, Gonçalves-Pires MRF, Alves de Oliveira JB, Faccioli LH and Costa-Cruz JM (2003) *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 849–851.
- Madhusudana SN, Muhamada K and Reeta M (2014) Demonstration of immune complexes by capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention* 1, 119.
- Martínez EZ, Louzada-Neto F and Pereira BB (2003) A curva ROC para testes diagnósticos. *Cadernos de Saúde Pública* 11, 07–31.
- Mendes T, Mizuki K, Ueta M, Miguel DC and Allegretti SM (2017) Strongyloidiasis current status with emphasis in diagnosis and drug research. *Journal of Parasitology Research* 2017, 1–13, ID 5056314.
- Nexlin R (2009) Circulating non-immune IgG complexes in health and disease. *Immunology Letters* 122, 141–144.
- Okyama K, Hay NT, Yoshimi H, Kishikawa N, Nishizawa JE, Roca Y, Revollo Guzmán RJ, Velarde FU, Karoda N and Hirayama K (2016) Proteomic profile of circulating immune complexes in chronic Chagas disease. *Parasite Immunology* 38, 609–617.
- Olan A, van Lieshout L, Marti H, Poldeman T, Polman K, Steinmann P, Stothard R, Thybo S, Verweij JJ and Magnussen P (2009) Strongyloidiasis – the most neglected of the neglected tropical diseases? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103, 967–972.
- Patil SA, Gourie-Devi M, Anand AR, Vijaya AN, Pratima N, Nedam K and Chandramuki A (1996) Significance of mycobacterial immune complexes (IgG) in the diagnosis of tuberculous meningitis. *Tubercle and Lung Disease* 77, 164–167.
- Paula FM and Costa-Cruz JM (2011) Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. *Parasitology* 138, 1331–1340.
- Pinho RT, Pedrosa RC, Costa-Martins P and Castello-Branco LR (1999) Saliva ELISA: a method for the diagnosis of chronic Chagas disease in endemic areas. *Acta Tropica* 72, 31–38.
- Ribeiro VS, Feliciano ND, Gonaga HT, Costa IN, Gonçalves-Pires MRF, Ueta MT and Costa-Cruz JM (2010) Detergent fraction of heterologous antigen to detect IgA and IgG in strongyloidiasis using saliva and serum paired samples. *Immunology Letters* 134, 69–74.
- Ruggi E, Mattos T and Brindis AP (1954) Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes: modificações do método de Baermann. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 14, 5–8.
- Santos LP, Santos FLP and Soares NM (2007) Prevalência de parasitoses intestinais em pacientes atendidos no hospital universitário professor Edgar Santos, Salvador – Bahia. *Revista de Patologia Tropical* 36, 237–246.
- Saengsuda P, Sithithaworn J, Tesana S, Pinkor S, Bonnamart T, Mairiang E, Yongvanit P, Duenngul K and Sithithaworn P (2012) Diagnostic values of parasite-specific antibody detections in saliva and urine in comparison with serum in opisthorchiasis. *Parasitology International* 61, 196–202.
- Schür F, Tröschdorf U, Giardina F, Khieu V, Math S, Marti H, Voumtsova P and Odermatt P (2013) *Strongyloides stercoralis*: global distribution and risk factors. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7, e2288.
- Upamankar P, Phongsri S and Morakote N (1999) Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60, 967–973.

1  
2 **4.2. ARTIGO 2**

3  
4 **Evaluation of the Dot-ELISA as a diagnostic test for human strongyloidiasis**  
5 **based on the detection of IgA in saliva**

6  
7 Larissa Rodrigues Bosqui, Marcelo Andreetta Corral, Débora Levy, Sérgio Paulo  
8 Bydlowski, Ronaldo César Borges Gryscek, Luiz Antonio Custodio, Wander  
9 Rogério Pavanelli, Ivete Conchon-Costa, Julia Maria Costa-Cruz, Fabiana Martins  
10 de Paula, Idessania Nazareth Costa.

11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19 **\*Será submetido para:** *Experimental Parasitology*

20  
21 QUALIS: B2

22  
23 F.I: 1.821  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43

1  
2 **Evaluation of the Dot-ELISA as a diagnostic test for human**  
3 **strongyloidiasis based on the detection of IgA in saliva**

4  
5 Larissa Rodrigues Bosqui<sup>a</sup>, Marcelo Andreetta Corral<sup>b</sup>, Débora Levy<sup>b</sup>, Sérgio Paulo  
6 Bydlowski<sup>b</sup>, Ronaldo César Borges Gryscek<sup>b</sup>, Luiz Antonio Custodio<sup>a</sup>, Wander Rogério  
7 Pavanelli<sup>a</sup>, Ivete Conchon-Costa<sup>a</sup>, Julia Maria Costa-Cruz<sup>c</sup>, Fabiana Martins de Paula<sup>b</sup>,  
8 Idessania Nazareth Costa<sup>a,\*</sup>

9  
10 <sup>a</sup> State University of Londrina, UEL. Rodovia Celso Garcia Cid Campus Universitário,  
11 Londrina, PR CEP 86051-990. Brazil, Londrina-PR, Brazil

12  
13 <sup>b</sup> Faculty of Medicine from University of São Paulo, FMUSP. Av. Dr. Arnaldo, 455 -  
14 Cerqueira César, São Paulo, SP CEP 01246903. São Paulo-SP, Brazil

15  
16 <sup>c</sup> Federal University of Uberlândia, UFU. Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Uberlândia, MG  
17 CEP 38400-902. Brazil Uberlândia-MG, Brazil

18  
19 \*Corresponding author. State University of Londrina, UEL, Rodovia Celso Garcia Cid  
20 Campus Universitário, Londrina, PR. CEP 86051-990, Brazil. E-mail address:  
21 idessania@hotmail.com

22  
23  
24  
25 **Abstract**

26  
27 This study aimed to evaluate the use of saliva samples in the Dot-ELISA test for  
28 immunodiagnosis of human strongyloidiasis. The Dot-ELISA presented similar results to the  
29 ELISA test, with 70% and 60% positivity, respectively, for IgA in the saliva of  
30 copropositive patients. The Dot-ELISA with alternative saliva samples may be a suitable  
31 tool for diagnosing human strongyloidiasis, especially in populations with high levels of  
32 exposure to helminth.

33  
34 **Keywords:** strongyloidiasis; immunodiagnostic; Dot-ELISA; saliva; IgA; rapid test.  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

## 1. Introduction

Human strongyloidiasis is a neglected tropical disease that is prevalent in tropical and subtropical regions and may affect around 370 million people worldwide (Bisoffi et al., 2013; Buonfrate et al., 2015).

With minimal production and release of *Strongyloides stercoralis* larvae in feces, conventional microscopic methods may not detect the parasite and therefore chronic asymptomatic strongyloidiasis. So, methods that seek to better detect it are urgently needed, not only for people with an increased risk of chronic strongyloidiasis (transplant candidates, people undergoing chemotherapy, or people with systemic corticosteroids) (Siddiqui and Berk, 2001; Olsen et al., 2009), but also for people who live in endemic areas. In light of this, the serodiagnosis of human strongyloidiasis displays important diagnostic properties (Agrawal et al., 2009; Ribeiro et al., 2010).

Various serological tests to detect chronic strongyloidiasis have been developed, resulting in a considerable increase in diagnostic specificity and sensitivity (Bisoffi et al., 2014). However, serodiagnosis requires invasive collection to obtain blood, and it is not always possible in places with few resources, especially where *S. stercoralis* is endemic. Other clinical samples, such as urine and saliva, which can be easily collected, are being used more and more as preferential sample matrices for the diagnosis and screening of human strongyloidiasis (Bosqui et al., 2018; Eamudomkarn et al., 2018).

The secretion of antibodies present in the saliva, especially IgA, as it involves the most prominent antibody in the mucous membrane, presents a fundamental role in the start of infection, and is able to protect against the adhesion and invasion of different pathogens (Kilian and Russell, 1994).

In order to investigate the potential use of saliva to detect the IgA antibody anti-*S. stercoralis*, we exclusively used the Dot-ELISA test, which is widely accepted as a quick and versatile test for detecting different parasitic diseases (Pappas, 1998; Santos et al., 2000; Sampaio et al., 2015). The dot-ELISA technique has been described as appropriate for detecting antigens or antibodies in human and animal infectious diseases (Pinheiro et al., 2005; Coelho et al., 2007; El-Masry et al., 2008). In addition, the technique is easy to execute and interpret, it uses a conservative reagent that is efficient and portable in the field,

1 and it can be used for large volume tests or for a small number of determinations (Blanco et  
2 al., 2009).

3 Thus, the aim of this study was to evaluate the detection of IgA using saliva samples  
4 in the Dot-ELISA test for immunodiagnosis of human strongyloidiasis, with a view to  
5 possibly optimizing quick diagnosis and the conditions for its use in public health centers  
6 with basic levels of equipment and trained professionals.

## 7 8 **2. Materials and Methods**

9  
10 Feces and saliva samples were collected from 40 individuals from the State University  
11 of Londrina General Clinic Hospital. Feces samples were collected from each individual and  
12 processed using parasitological methods, in accordance with (Hoffmann et al., 1934; Faust  
13 et al., 1939; Kato and Miura, 1954) modified by (Katz et al., 1972) and the method of  
14 (Rugai et al., 1954) to divide them into three groups: (1) 10 patients with a positive  
15 parasitological result for *S. stercoralis*, (2) 10 patients with a history of positivity for *S.*  
16 *stercoralis*, corresponding to one year before this study, and (3) 20 individuals with a  
17 negative result for any parasitosis. Total non-stimulated saliva samples were collected using  
18 clean cottons after washing the oral cavity with water. After collection, the samples were  
19 distributed in aliquots of 1.5 mL and conserved at -20°C until use. Subsequently, the  
20 samples were slowly thawed and centrifuged at 12400g for 15 min. This study was approved  
21 by the Human Research Ethics Committee of the State University of Londrina (protocol  
22 1494·2013-56).

23 To produce the antigen (CEP-IMT 002/10), approximately 200,000 filarioid larvae of  
24 *Strongyloides venezuelensis* were resuspended in 10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM DTT,  
25 supplemented with a protease inhibitor cocktail, followed by sonication and centrifugation at  
26 12400g/4°C for 30 minutes. The pellet was resuspended in Urea 7M, Thiourea 2M, and  
27 CHAPS 2%, homogenized for 30 min/4°C, and centrifuged at 12400g/4°C for 30 minutes.  
28 The supernatant gave rise to the membrane antigen.

29 For the ELISA, polystyrene microplates were sensitized overnight at 4°C with 10 µg /  
30 mL of the diluted antigen in a carbonate-bicarbonate buffer (0.06 mol / L, pH 9.6), washed  
31 three times for 5 min with a phosphate saline solution buffer (0.01 mol / L, pH 7.2) (PBS)

1 containing Tween 20 at 0.05% (PBS-T), and blocked with PBS-T + 3% of skimmed milk  
2 (PBS-TM) for 45 min at 37°C. The saliva samples from the three groups were diluted (1:5)  
3 in PBS-TM and incubated for 45 min at 37°C. The peroxide-conjugated goat anti-human  
4 IgA secondary antibody (Sigma, St Louis, MO, USA) was diluted 1: 1000 in PBS-TM and  
5 incubated for 45 min at 37°C. The reaction was revealed with Tetramethylbenzidine (TMB,  
6 Life Sciences) and the optical densities were determined at 492 nm in an ELISA reader  
7 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). The reaction cut-off was determined with  
8 the help of a ROC curve using the Graph Pad Prisma 5.0 program. The ELISA index (EI)  
9 was calculated in accordance with the formula:  $EI = OD / \text{cut-off}$ . Values of  $EI > 1$  were  
10 considered positive (Corral et al., 2015).

11 The Dot-ELISA was adapted from Pinto et al. (1995). The 1 cm<sup>2</sup> nitrocellulose  
12 membranes were sensitized with 1.5mg of antigen for 1 hour, followed by overnight  
13 blocking with PBS-TM 5% in agitation and at 4°C. The saliva samples from the three groups  
14 were diluted 1:5 in PBSTM for 2h at ambient temperature. Subsequently, the membranes  
15 were washed five times for 1 min with PBS-T and incubated with peroxide-conjugated anti-  
16 IgA human conjugate diluted 1:1000 for 2h at ambient temperature. The reaction was  
17 revealed with chemoluminescent substrate in the Scanner Luminescent image analyzer  
18 equipment (Fujifilm, Minato, Tokyo, JP) and the results were interpreted with the help of the  
19 Image Quant LAS 400 program version 1.2 (GE, Fairfield, CT, USA).

20 The area under ROC curve (AUC), an overall index of diagnostic accuracy, was cal-  
21 culated. Values close to 1 indicate an informative test and values close to 0.5 indicate an  
22 uninformative test. Test performance was assessed based on positive and negative samples  
23 (P and N), true and false positive results (TP and FP) and true and false negative results (TN  
24 and FN). Each test used was analyzed in terms of: sensitivity (Se) and specificity (Sp) and  
25 Kappa index.

26

### 27 **3. Results and Discussion**

28

29 Regarding human strongyloidiasis, there are already reports on the use of saliva to  
30 detect antibodies based on ELISA immunoassays (Bosqui et al., 2015; Bosqui et al., 2018),  
31 however, our work is pioneering in its use of the Dot-ELISA technique to detect IgA in  
32 saliva.

1 In our study, we assessed the Dot-ELISA assay as having good sensitivity and  
2 specificity results, enabling the detection of IgA in small quantities of saliva.

3 In an effort to develop quicker and lower cost immunoassays for detecting different  
4 diseases, the ELISA format was not modified. In this specific case, the nitrocellulose paper  
5 substituted the plastic wells as a solid support for binding the antigen and a precipitable  
6 chromogenic substrate which, in the oxidated form, appears as a colored point on the  
7 nitrocellulose membrane (Pappas, 1988).

8 The comparison of the ELISA and Dot-ELISA techniques for detecting IgA anti-*S.*  
9 *stercoralis* is illustrated in table 1. The Dot-ELISA presented consistent results with the  
10 ELISA test, with similar positivity and negativity in the saliva samples, with 70% and 60%  
11 sensitivity and 85% and 90% specificity, respectively (table 2), making the heterologous  
12 antigen highly promising for future trials, since it has demonstrated excellent results in  
13 different studies (Gonçalves et al., 2012; Bosqui et al., 2015; 2018) consistent with the other  
14 authors, who report the efficiency of the diagnosis both in protozoan and helminth, using  
15 saliva samples in the Dot-ELISA technique in comparison with the traditional ELISA  
16 (Santos et al., 2000; Sampaio et al., 2015).

17 With regards to carrying out the technique, the blocking displayed optimal  
18 performance, and the dilution value of the salivas employed in carrying out the test was 1:5.  
19 In addition, the 1:1000 dilution of the conjugate provided visual distinction between the  
20 salivas (Figure 1).

21 IgA antibody levels in saliva samples may be related to the life cycle of the parasite,  
22 since the response occurs in the pulmonary and intestinal mucus, which involves  
23 secretory and systemic responses. McGhee and Mestecky (Mc Ghee and Mestecky, 1990)  
24 believe that the presence of IgA in saliva secretions can be divided into: recent contact with  
25 a parasite, active infection, or reinfection. These factors warrant the use of saliva as an  
26 alternative diagnostic tool for human strongyloidiasis (McGhee and Mestecky, 1990;  
27 Ribeiro et al., 2010; Bosqui el., 2015).

28 Unfortunately precise immunodiagnosis is not yet available in most health centers and  
29 access to medical diagnosis is variable for many segments of the population. For this reason,  
30 we believe that the Dot-ELISA technique described here could be a suitable tool for

1 diagnosing human strongyloidiasis, especially in populations with high levels of exposure to  
2 helminth.

#### 4 **4. Conclusion**

5  
6 In conclusion, we understand that the results derived from the use of the technique  
7 may, in the future, enable the application of a commercial test for detecting IgA anti-S.  
8 *stercoralis* in saliva samples, providing parasitologists, clinicians, and epidemiologists with  
9 a low cost trial for screening both individual patients with diagnostic urgency and large  
10 populations, especially in endemic areas.

#### 12 **Conflict of interest statement**

13 None

#### 15 **Funding**

16  
17 This study was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de  
18 Pessoal de Nível Superior (CAPES – Grant No. 40002012026M9 (L.R.B.) and Fundação de  
19 Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP—Grant no. 2013/03304-0).

#### 21 **Acknowledgments**

22 We acknowledge the patients and volunteers who agreed to participate in this study and  
23 Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário de Londrina, Paraná state, Brazil.

#### 25 **References**

26  
27 Agrawal, V., Agarwal, T., Ghoshal, U.C., 2009. Intestinal strongyloidiasis: a diagnosis  
28 frequently missed in the tropics. *Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg.* 103: 242-246. [http://doi:  
29 10.1016/j.trstmh.2008.08.009](http://doi:10.1016/j.trstmh.2008.08.009).

30  
31 Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Montresor, A., Requena-Méndez, A., Munõs, J., Krolewiecki,  
32 A.J., Gotuzzo, E., Mena, M.A., Chiodini, P.L., Anselmi, M., Moreira, J., Albonico, M.,  
33 2013. *Strongyloides stercoralis*: A Plea for Action. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 7: e2214.  
34 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002214>.

35  
36 Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Sequi, M., Mejia, R., Cimino, R.O., Krolewiecki, A.J., Albonico,  
37 M., Gobbo, M., Bonafini, S., Angheben, A., Requena-Mendez, A., Muños, J., Nutman, T.B.,

- 1 2014. Diagnostic accuracy of five serologic tests for *Strongyloides stercoralis* infection.  
2 PLoS. Negl. Trop. Dis. 8: e2640. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002640>.
- 3
- 4 Blanco, R.M., Takei, K., Romero, E.C., 2009. Leptospiral glycolipoprotein as a candidate  
5 antigen for serodiagnosis of human leptospirosis. Lett. Appl. Microbiol. 49: 267-273.  
6 <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02650.x>.
- 7
- 8 Bosqui, L.R., Gonçalves, A.L., Gonçalves-Pires, M.R., Custodio, L.A., Menezes, M.  
9 C.N.D., Murad, V.A., Paula, F.M., Pavanelli, W.R., Conchon-Costa, I., Costa-Cruz, J.M.,  
10 Costa, I.N., 2015. Detection of parasite-specific IgG and IgA in paired serum and saliva  
11 samples for diagnosis of human strongyloidiasis in northern Paraná state, Brazil. Acta. Trop.  
12 150: 190-195. <https://doi:10.1016/j.actatropica.2015.07.026>.
- 13
- 14 Bosqui, L.R., Gonçalves, A.L.R., Gonçalves-Pires, M.R.F., Pavanelli, W.R., Conchon-  
15 Costa, I., Costa-Cruz, J.M., Costa, I.N., 2018. Immune complex detection in saliva samples:  
16 an innovative proposal for the diagnosis of human strongyloidiasis. Parasitol. 145: 1090-  
17 1094. <https://doi:10.1017/S0031182017002232>.
- 18
- 19 Buonfrate, D., Sequi, M., Mejia, R., Cimino, R.O., Krolewiecki, A.J., Albonico, M., Degani,  
20 M., Tais, S., Angheben, A., Requena-Mendez, A., Muñoz, J., Nutman, T.B., Bisoffi, Z.,  
21 2015. Accuracy of Five Serologic Tests for the Follow up of *Strongyloides stercoralis*  
22 Infection. PLoS. Negl. Trop. Dis; 9: e0003491.  
23 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003491>.
- 24
- 25 Coelho, J.S., Soares, I.S., Lemos, E.A., Jimenez, M.C.S., Kudó, M.E., Moraes, S.L.,  
26 Ferreira, A.W., Sanchez, M.C.A., 2007. A multianalyte dot-ELISA for simultaneous  
27 detection of malaria, Chagas disease, and syphilis-specific IgG antibodies. Diagn. Microbiol.  
28 Infect. Dis. 58: 223-230. <https://doi:10.1016/j.diagmicrobio.2006.12.011>.
- 29
- 30 Corral, M.A., Paula, F.M., Gottardi, M., Meisel, D.M., Chieffi, P.P., Gryscek, R.C., 2015.  
31 Membrane fractions from *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human  
32 strongyloidiasis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 57: 77-80.  
33 <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652015000100011>.
- 34
- 35 Eamudomkarn, C., Sithithaworn, P., Kamamia, C., 2018. Diagnostic performance of urinary  
36 IgG antibody detection: A novel approach for population screening of strongyloidiasis.  
37 PLoS. One 13: e0192598. <http://doi:10.1371/journal.pone.0192598>.
- 38
- 39 El-Masry, S., El-Kady, I., Zaghoul, M.H., Al-Badrawey, M.K., 2008. Rapid and simple  
40 detection of a *Mycobacterium* circulating antigen in serum of pulmonary tuberculosis  
41 patients by using a monoclonal antibody and fast-dot-ELISA. Clin. Biochem. 41: 145-151.  
42 <http://doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.11.008>.
- 43
- 44 Faust, E.C., Sawitz, W., Tobie, J., 1939. Comparative efficiency of various techniques for  
45 diagnosis of protozoa and helminthes in feces. J. Parasitol. 25: 241-262.
- 46

- 1 Gonçalves, A.L.R., Nunes, D.S., Gonçalves-Pires, M.R.F., Ueta, M.T., Costa-Cruz, J.M.,  
2 2012. Use of larval, parasitic female and egg antigens from *Strongyloides venezuelensis* to  
3 detect parasite-specific IgG and immune complexes in immunodiagnosis of human  
4 strongyloidiasis. *Parasitol.* 139: 956-961. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000054>.  
5
- 6 Hoffmann, W.A., Pons, J.A., Janer, J.L., 1934. The sedimentation concentration method in  
7 schistosomiasis *mansoni*, Puerto Rico. *J. Public. Health. Trop. Med.* 9: 283-291.  
8
- 9 Kato, K., Miura, M., 1954. Comparative examination. *Jap. J. Parasit.* 3: 35.  
10
- 11 Katz, N., Chaves, A., Pellegrino, J., 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear  
12 technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 14: 397-400.  
13
- 14 Kilian, M., Russell, M.W. 1994. Function of mucosal immunoglobulins. In Ogra, P.L.,  
15 Mestecky, J., Lamm, M.E., et al. *Handbook of Mucosal Immunology.* 127-137.  
16
- 17 McGhee, J.R., Mestecky, J., 1990. In defense of mucosal surfaces. Development of novel  
18 vaccines for IgA responses protective at the portals of entry of microbial pathogens. *Infect.*  
19 *Dis. Clin. North. Am.* 4: 315-341.  
20
- 21 Olsen, A., Van Lieshout, L., Marti, H., Polderman, T., Polman, K., Steinmann, P., Stothard,  
22 R., Thybo, S., Verweij, J.J., Magnussen, P., 2009. Strongyloidiasis - the most neglected of  
23 the neglected tropical diseases? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103: 967-972. [http://doi:](http://doi:10.1016/j.trstmh.2009.02.013)  
24 [10.1016/j.trstmh.2009.02.013](http://doi:10.1016/j.trstmh.2009.02.013).  
25
- 26 Pappas, M.G., 1988. Recent applications of the Dot-ELISA in immunoparasitology. *Vet.*  
27 *Parasitol.* 29: 105-129.  
28
- 29 Pinheiro, A.M., Costa, M.F., Paule, B., Vale, V., Ribeiro, M., Nascimento, I., Schaer, R.E.,  
30 Almeida, M.A.O., Meyer, R., Freire, S.M., 2005. Serologic immunoreactivity to *Neospora*  
31 *caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, Western Blotting and  
32 dot-ELISA. *Vet. Parasitol.* 130: 73-79. <http://doi:10.1016/j.vetpar.2005.03.018>.  
33
- 34 Pinto, P.L., Kanamura, H.Y., Silva, R.M., Rossi, C.R., Andrade Júnior, H.F., Amato Neto,  
35 V., 1995. Dot-ELISA for the detection of IgM and IgG antibodies to *Schistosoma mansoni*  
36 worm and egg antigens, associated with egg excretion by patients. *Rev. Inst. Med. Trop. São*  
37 *Paulo.* 37:109-115.  
38
- 39 Ribeiro, V.S., Feliciano, N.D., Gonzaga, H.T., Idessânia, N.C., Gonçalves-Pires, M.R.F.,  
40 Ueta, M.T., Costa-Cruz, J.M., 2010. Detergent fraction of heterologous antigen to detect IgA  
41 and IgG in strongyloidiasis using saliva and serum paired samples. *Immunol. Lett.* 134: 69-  
42 74. [http://doi: 10.1016/j.imlet.2010.08.011](http://doi:10.1016/j.imlet.2010.08.011).  
43
- 44 Rugai, E., Mattos, T., Brisola, A.P., 1954. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das  
45 fezes: modificações do método de Baermann. *Rev. Inst. Adolfo. Lutz.* 14: 5-8.  
46

- 1 Sampaio, B.F.C., Meireles, L.R., Andrade Júnior, H.F., 2015. Padronização da metodologia  
2 dot-ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- *Toxoplasma gondii* em saliva. Rev. Inst.  
3 Adolfo. Lutz. 74: 310-319.  
4
- 5 Santos, M.M., Garcia, T.C., Orsini, M., Disch, J., Katz, N., Rabello, A., 2000. Oral fluids for  
6 the immunodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.  
7 94:289-292.  
8
- 9 Siddiqui, A.A., Berk, S.L., 2001. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. Clin.  
10 Infect. Dis. 33:1040-1047. [http:// doi: 10.1086/322707](http://doi:10.1086/322707).  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

1 **Table 1.** Comparison of ELISA and Dot-ELISA techniques for detection of IgA anti-*S.*  
 2 *stercoralis* in saliva samples

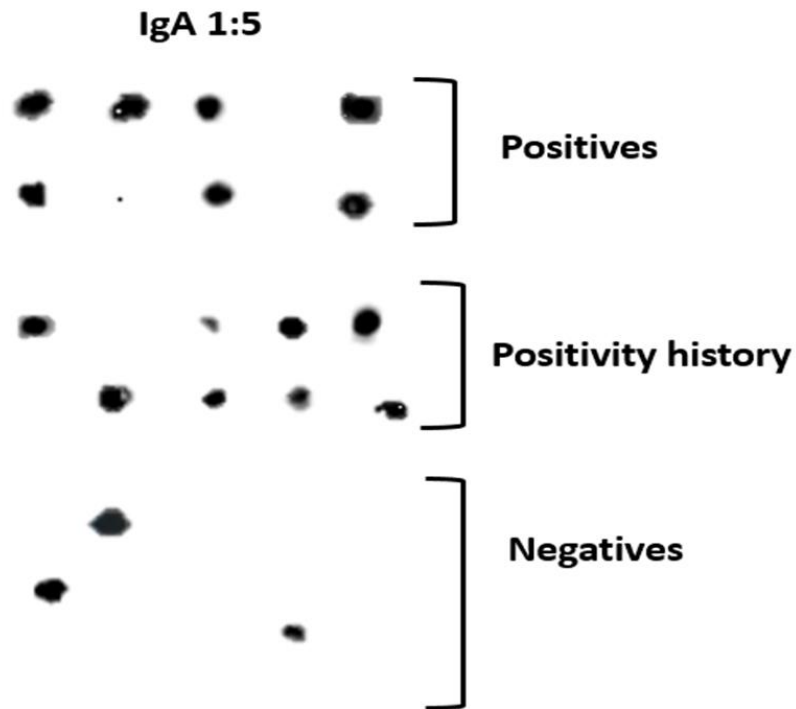
Groups (n= 40)	Comparison of IgA detection in saliva samples	
	ELISA	Dot-ELISA
Positive parasitological (n=10)	60% (n=6)	70% (n=7)
History of positivity (n=10)	80% (n=8)	80% (n=8)
Healthy (n=20)	10% (n=2)	15% (n=3)

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12

13 **Table 2.** Sensitivity (Se), specificity (Sp), area under the ROC curve (AUC) and Kappa  
 14 Index in saliva samples for IgA anti-*Strongyloides* detection.

	ELISA				Dot-ELISA			
	Se (%)	Sp (%)	AUC	Kappa Index	Se (%)	Sp (%)	AUC	Kappa Index
IgA	60	90	0.80	0.52	70	85	0.80	0.66

15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

1  
2  
34  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

**Figure 1.** Dot-ELISA test using heterologous antigen of *Strongyloides venezuelensis* in saliva samples in the following groups: copropositive for *S. stercoralis* (n=10), history of copopositivity for *S. stercoralis* (n=10), and negative (n=20).

1 **4.3. ARTIGO 3**

2  
3 **Molecular and Immune Diagnosis: Further Testing for Human**  
4 **Strongyloidiasis**

5  
6 Larissa R. Bosqui, Priscilla D. Marques, Gessica B. de Melo, Maria do Rosário F.  
7 Gonçalves-Pires, Fernanda M. Malta, Wander R. Pavanelli, Ivete Conchon-Costa,  
8 Julia M. Costa-Cruz, Fabiana M. Paula, Idessania N. Costa.

9  
10  
11  
12  
13  
14  
15 **Molecular Diagnosis & Therapy**, 2018

16 QUALIS: B1

17  
18  
19 F.I.: 2.71

20  
21 Volume 22(4), Páginas 485–491.

22  
23 [doi.org/10.1007/s40291-018-0340-1](https://doi.org/10.1007/s40291-018-0340-1)  
24  
25  
26  
27



ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

## Molecular and Immune Diagnosis: Further Testing for Human Strongyloidiasis

Larissa R. Bosqui<sup>1</sup> · Priscilla D. Marques<sup>2</sup> · Jessica B. de Melo<sup>2</sup> ·  
 Maria do Rosário F. Gonçalves-Pires<sup>3</sup> · Fernanda M. Malta<sup>2</sup> · Wander R. Pavanelli<sup>1</sup> ·  
 Ivete Conchon-Costa<sup>1</sup> · Julia M. Costa-Cruz<sup>3</sup> · Fabiana M. Paula<sup>2</sup> · Idessania N. Costa<sup>1</sup>

© Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018

### Abstract

**Introduction** Detection of *Strongyloides stercoralis* larvae is particularly challenging because only a small number of larvae are released into the feces, regardless of infection stage.

**Objective** Our objective was to apply conventional polymerase chain reaction (PCR) to the detection of *S. stercoralis* DNA in feces samples to evaluate its performance in samples of patients with strongyloidiasis and compare results with those of immunodiagnosis.

**Methods** Stool, serum, and saliva samples were collected from each individual ( $n = 48$ ) at the clinic hospital of the State University of Londrina, Brazil, for parasitological, immunological, and molecular tests. Stool samples were processed via parasitological methods. Serum samples were used for immunoglobulin G (IgG) detection and saliva samples for IgA detection by ELISA.

**Results** For amplification by conventional PCR, two different primers were used: species specific (101 bp) and genus specific (392 bp). The results showed that 34 (97.1%) of the 35 copro-positive individuals for *S.*

*stercoralis* were positive for serum IgG and 19 (54.3%) were positive for salivary IgA. Regarding molecular analysis, both primers (species and genus specific) demonstrated positivity in 100% of the samples, which was confirmed by sequencing the positive samples.

**Conclusion** Complementary examinations of the parasitological method demonstrated excellent results in the context of the diagnosis of strongyloidiasis, especially in asymptomatic patients with irregular larval release in the feces.

### Key Points

Conventional polymerase chain reaction (PCR) has been proven to be an important molecular technique for the diagnosis of human strongyloidiasis.

We obtained a 100% positive rate when screening *Strongyloides stercoralis* DNA using two different primers.

An optimum concordance occurred between serological and molecular diagnosis ( $\kappa = 0.909$ ).

✉ Larissa R. Bosqui  
[larissabosqui@hotmail.com](mailto:larissabosqui@hotmail.com)

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Patológicas, CCB, Laboratório de Parasitologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid Campus Universitário, Londrina, PR CEP 86051-990, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455 - Cerqueira César, São Paulo, SP CEP 01246903, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará 1720, Uberlândia, MG CEP 38400-902, Brazil

Published online: 21 June 2018

△ Adis

[1, 2]. It is responsible for human strongyloidiasis, an infection that is included in the list of neglected tropical diseases [3] primarily because it is difficult to diagnose. *S. stercoralis* infection often remains asymptomatic. However, immunosuppressed patients, such as those receiving steroid treatment, may develop hyperinfection and/or disseminated infection [4].

The screening for *S. stercoralis* larva in coprological testing is one of the most challenging diagnoses. The main parasitological methods used are techniques based on hydro thermotropism and culture in agar plate; even so, false-negative results are possible [5–7]. Diagnosis using serological tests is highly sensitive in patients with chronic infection but less sensitive in immunocompromised individuals and does not distinguish between recent and previous infections [3, 8].

DNA isolation techniques from fresh fecal samples are feasible, realistic and applicable in most endemic countries and are increasingly being used for the diagnosis of parasitic infections as they add high sensitivity and specificity, leading to increased diagnoses for human strongyloidiasis [5, 9–11]. Diagnostic laboratories have been innovating with the use of molecular techniques, aiming to increase the efficiency and speed of results [1]. The advantages of polymerase chain reaction (PCR) over serology may include high specificity and reduced cross-reactivity with other pathogens in feces [12].

Given the few reports on the use of conventional PCR associated with serology in the diagnosis of strongyloidiasis [13–17], the objective of this study was to apply conventional PCR in the screening of *S. stercoralis* DNA in feces samples from patients with strongyloidiasis, establishing a comparison with immunodiagnosis using serum and saliva samples.

## 2 Materials and Methods

### 2.1 Biological Samples

The samples were obtained at the clinic hospital of the State University of Londrina, Paraná state, Brazil. Stool, blood and saliva samples were collected from each individual for parasitological, immunological and molecular tests.

We collected a total of 48 samples divided into (1) 35 stool fresh samples positive for *S. stercoralis* and (2) 13 fresh stool samples collected from individuals with a history of positivity for *S. stercoralis*, corresponding to 1 year before the study. Stool samples were processed by parasitological methods, according to Hoffmann et al. [18], Faust et al. [19], Kato and Miura [20] modified by Katz et al. [21], and the method of Rugai et al. [22]. After

carrying out the parasitological assays, the stool samples were maintained at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Blood (9 ml) was collected from each individual, and samples were centrifuged at  $350\times g$  for 5 min for collection of serum. The material was stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use. Before the collection of saliva, subjects were examined for oral candidiasis, oral herpes, gingivitis, gum recession, and oral lesions, and the oral cavity was washed with water. Approximately 3 ml of unstimulated whole saliva was collected per subject using clean cotton swabs, and within 1 h samples were centrifuged at  $12,400\times g$  for 15 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Sorvall RC 5C plus, USA) and stored in aliquots at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  [23, 24]. Serum and saliva samples were used to detect immunoglobulin G (IgG) antibodies.

### 2.2 Parasite Collection and Preparation

*Strongyloides venezuelensis* third-stage (L3) infective larvae were obtained from feces of infected Wistar rats (*Rattus norvegicus*) and maintained in charcoal culture at  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 48 h. Larvae were recovered and concentrated using the method of Rugai et al. [22]. They were washed five times with phosphate buffered saline (PBS; 0.01 mol/l, pH 7.2) and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use. The *S. venezuelensis* L3 alkaline extract was prepared according to Machado et al. [25].

### 2.3 ELISA Detection of Immunoglobulin G (IgG) Serum and IgA Saliva

Preliminary experiments were performed to determine optimal conditions for ELISA by titration of reagents (antigenic extract, serum and saliva samples, controls and conjugate). Briefly, polystyrene microtiter plates (BioAgency Laboratories, São Paulo, Brazil) were incubated for 18 h at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  with  $5\text{ }\mu\text{g/ml}$  *S. venezuelensis* L3 alkaline extract in 0.06 mol/l of carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6). The plates were washed three times with PBS containing 0.05% Tween-20. After washing, unblocked plates were incubated with serum samples ( $50\text{ }\mu\text{l/well}$ ) at 1:80 dilution (IgG detection) or with saliva samples ( $50\text{ }\mu\text{l/well}$ ) at 1:2 dilution (IgA detection) and incubated for 45 min at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Plates were then coated with peroxidase-conjugated goat anti-human IgG secondary antibody (Sigma) at a dilution of 1:2000 for serum sample or peroxidase-labeled goat anti-human IgA conjugate (Sigma) for saliva sample at the ideal dilution of 1:500, for a final sample volume of  $50\text{ }\mu\text{l/well}$ , and incubated for 45 min at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The reaction was visualized by adding the enzyme-substrate ( $5\text{ }\mu\text{l}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Merck, São Paulo) with 5 mg o-phenylenediamine (OPD) in 12.5 ml of citrate-phosphate buffer (0.1 M), pH 5.0. The plates were incubated for 15 min at room temperature. The reaction was stopped by adding  $25\text{ }\mu\text{l}$  2 N

△ Adis

1  
2

## Testing for Human Strongyloidiasis

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to each well. The optical density (OD) was determined at 492 nm using a Titertek Multiskan plate reader (FlowLaboratories, McLean, VA, USA). Results were expressed as ELISA index (EI), where the cut-off value was calculated by receiver operating characteristic (ROC) curves.

#### 2.4 DNA Extraction

Approximately 500 mg of stool sample was centrifuged at 14,000 rpm for 1 min. The pellet was washed twice with 0.01 M PBS, pH 7.4. DNA was extracted from the pellet using the commercial QIAamp® DNA Stool MiniKit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA was eluted with 100 µl elution buffer and quantified using a NanoDrop ND-1000 UV-VIS spectrophotometer v.3.2.1 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

#### 2.5 PCR Amplification

For amplification by PCR, two different primer pairs were used: species-specific primers (forward 5'-GAATTC-CAAGTAAACGTAAGTCATTAGC-3' and reverse 5'-TGCCTCTGGATATTGCTCAGTTC-3') described by Verweij et al. [26] and genus-specific primers (forward 5'-AAAGATTAAGCCATGCATG-3' and reverse 5'-GCCTGCTGCCTTCCTTGGGA-3') described by Dorris et al. [27]. PCR was performed in a Master cycler ep gradient S thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The reaction was performed in a final volume of 10 µl containing 6 µl PCR mix (1.5 µl bovine serum albumin (BSA 20 mg/ml); 0.3 µl de H<sub>2</sub>O; 2.0 µl 5X PCR buffer; 0.4 µl dNTPs; 0.8 µl MgCl<sub>2</sub>; 0.4 µl each primer (20 pmol/µl) e 0.2 µl *GoTaq*® DNA Polymerase (5 U/µl, Promega Corporation, Madison, WI, USA) and 4 µl of extracted DNA. An initial denaturation step at 94 °C for 2 min was followed by 30 cycles of 94 °C for 1 min (denaturation), 61.8 °C (annealing) for 1 min and 72 °C for 1 min (extension), followed by a final extension step at 72 °C for 2 min. The electrophoresis was performed by 2% agarose gel with the addition of *SYBR safe* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA). Gels were visualized in an ultraviolet light transilluminator (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation) and photographed for further analysis.

For internal amplification control, all DNA samples were amplified using the primers (forward 5'ACACAACCTGIGTTCCTAGC3' and reverse 5'CAACTTCATCCACGTTCCACC 3') that amplify the 110-bp region of the human  $\beta$ -globin gene. The size of the PCR products for the species-specific and genus-specific primers was 101 and 392 bp, respectively. The molecular

assays were performed using DNA from stool samples of patients with strongyloidiasis, and negative controls (PCR mix without DNA template) were included in each amplification run. DNA from 15 negative stool samples were also included in the evaluation of the PCR method, as additional negative controls.

The DNA obtained from stool samples was amplified via conventional PCR using the species-specific and genus-specific primers. Filariform larvae of *S. stercoralis* were collected from pellets of positive samples, and the DNA extracted from them was used as a positive control; negative controls (PCR mix without DNA template) were included in each amplification run.

All PCR products were sequenced based on the methodology of Sanger et al. [28], using dideoxynucleotides (ddNTPs) with fluorescence labels, according to the ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Corporation). Sequences obtained were aligned using the BioEdit program (Biological Sequence Alignment Editor) (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>) and compared with previously reported sequences from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/tbl2asn2>), using the BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool).

#### 2.6 Data Analysis

Statistical analysis was performed using the software Stata version 11 (Stata Corporation, TX, USA). The concordance between the results of the parasitological methods and PCR assay was analysed using the Kappa coefficient ( $\kappa$ ). Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

### 3 Results

Table 1 demonstrates a positive result for the IgG antibodies screened in the paired samples of serum and saliva, for both groups. We can see that by using samples of serum and saliva, of the 35 individuals copro-positive for *S. stercoralis*, 34 (97.1%) were positive for IgG in the serum and four (11.4%) in the saliva, whereas the group with positive history for *S. stercoralis*—but copro-negative in our study—demonstrated a screening index of 13 (100%) for IgG serum and seven (53.8%) for IgG saliva.

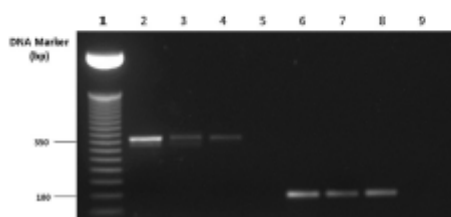
The molecular analysis was carried out in triplicate, with the PCR test using primer pairs of specific species and specific genus, and initially sequencing the PCR products obtained from the DNA of filariform *S. stercoralis* larvae. Table 1 presents the results obtained through conventional PCR of specific species and specific genus. The expected DNA fragments (~ 101 and 392 bp) were detected in all

3  
4  
5  
6  
7  
8  
9

**Table 1** Comparison of parasitological, immune, and molecular diagnosis in *Strongyloides stercoralis* copro-positive individuals

Groups	Serology		Molecular	
	Serum (IgG)	Saliva (IgA)	Gender specific	18s
Positive parasitological (n = 35)	34 (97.1%)	19 (54.3%)	35 (100%)	35 (100%)
Negative parasitological (n = 13)	13 (100%)	7 (53.8%)	13 (100%)	13 (100%)

IgA immunoglobulin A, IgG immunoglobulin G



**Fig. 1** Polymense chain reaction (PCR) products on 2.0% agarose gel. Amplification of the *18S* gene with species-specific and genus-specific primer pairs. Lane 1, DNA size markers (50-bp ladder; Thermo Scientific); lane 2, positive control (*Strongyloides stercoralis* larvae DNA); lanes 3 and 4, stool samples from patients infected with *S. stercoralis* (392 bp); lane 5, negative control (PCR mix with water); lane 6, positive control larvae; lanes 7 and 8, stool samples from patients infected with *S. stercoralis* (101 bp); lane 9, negative control (PCR mix with water)

samples using species- and genus-specific primers, respectively (Fig. 1).

All samples had an amplification of the  $\beta$ -globin gene ( $\sim 110$  pb, data not shown). No DNA amplification of the target fragment was observed in the negative samples. All PCR positive samples were successfully sequenced, and the sequences obtained exhibited 98–100% similarity to *S. stercoralis* sequences deposited in the GenBank database (BLAST).

Figure 2 demonstrates a high rate of relationship between immune and molecular diagnosis. A concordance of 100% occurred between the samples of serum and saliva, which were positive for IgG anti-*S. stercoralis* and tested using the two primers in both groups. This study indicated optimum concordance between serological and molecular diagnosis, with  $\kappa$  values of 0.909.

#### 4 Discussion

The development of new methods, both immunological and molecular to screen *S. stercoralis*, as well as novel combinations of the new technology, have been crucial to achieve a accurate diagnosis of human strongyloidiasis. Furthermore, molecular techniques are increasingly being applied to various helminths and protozoa. Furthermore,

molecular techniques are increasingly being applied as diagnostic tools for various helminths and protozoa [9, 29, 30].

It can be difficult to establish an early diagnosis and determine the severity of this infection, particularly in immunocompromised patients. This is mainly because the low and irregular levels of larvae released in the faeces [31] make parasitological diagnosis difficult. Therefore immunological tests such as immunoenzymatic assay (ELISA), and molecular tests are indicated for the diagnosis due to their higher sensitivity [32–34].

The use of alkaline extract L3 of *S. venezuelensis* produced a 97.1% positive rate for IgG in the serum for the copro-positive group for *S. stercoralis* and 100% for the group with a positive history, representing a high positivity for serological diagnosis. This is a great improvement on other studies that have demonstrated decreased screening levels for IgG antibodies in samples of serum [23, 24].

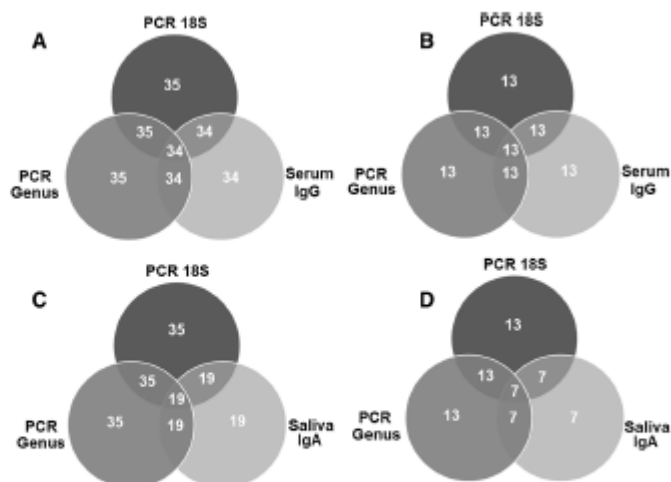
IgG screening in serum to diagnose strongyloidiasis is well-established; studies using crude extract of filariform *S. stercoralis* larvae to screen IgG in serum have generated results with sensitivity values ranging from 82 to 95% and specificity values between 29 and 99% [35, 36]. However, screening for anti-*S. stercoralis* antibodies may be compromised, especially in immunocompromised individuals, since differences in infection severity, larval excretion, parasite-host interaction, and environmental factors are closely related [37]. According to Johnston et al. [38], these differences likely result from the different populations studied as well as distinct phases of the disease. Our results showed a lower positivity with saliva compared with serum for the detection of IgG antibodies. False-negative results in ELISA, using saliva samples, may be attributed to undetectable antibody levels because of the low parasite load in chronic infections [39, 40].

Therefore, combining appropriate serological tests to complement fecal testing is essential for strongyloidiasis diagnosis. In addition to immunodiagnosis, it is increasingly common for parasitology laboratories to adopt molecular techniques based on various screening kits, bringing the advantages of high performance, relative operator independence, and these are widely available [12, 41].

△ Adis

## Testing for Human Strongyloidiasis

**Fig. 2** Venn diagram representing serological results in paired samples of serum (IgG) (a, b) and saliva (IgA) (c, d) and molecular diagnosis using PCR with two different primers (species and genus specific), a and c in *Strongyloides stercoralis* copro-positive individuals for b and d in individuals with positive history for *S. stercoralis*. IgA immunoglobulin A, IgG immunoglobulin G, PCR polymerase chain reaction



Our study demonstrated high positivity with PCR for strongyloidiasis diagnosis, which differs from other reports [13, 26, 42]. Our results were in alignment with those of Repetto et al. [5], who proved the PCR-based method did not miss any case of strongyloidiasis confirmed by reference tests. The advantages of PCR over serology include high specificity and the ability to be used as an optimum marker, enabling patient monitoring in the conversion to a negative result throughout treatment [43].

The literature describes the primer species and genus as important markers for strongyloidiasis molecular diagnosis [5, 26, 33, 44], and these can be used as alternative tools for the screening of *S. stercoralis* in samples of human feces, especially in tropical areas. This is supported by our results with the confirmation of sequencing of all amplified samples.

The main limitation of the present study was the small sample size, due to difficulties obtaining paired samples of feces, blood and saliva from each patient.

Our study demonstrated that the combination of different methods can aid clinical trials and scenarios that require rapid and accurate diagnosis, as in the case of strongyloidiasis. Furthermore, DNA screening in fecal samples of individuals with positive serology was efficient at excluding cases of past infections.

#### Compliance with Ethical Standards

**Funding** This study was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES—Grant no. 40002012026M9 [LRB] and Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP—Grant no. 2013/03304-0).

**Conflict of interest** LRB, PDM, GBdM, MdRFG-P, FMM, WRP, IC-C, JMC-C, FMP and INC have no conflicts of interest.

**Ethical Approval and Informed Consent** The study was approved by the ethics committee on human studies at the State University of Londrina (protocol number 1.306.715).

#### References

- Buonfrate D, Sequi M, Mejia R, Cimino RO, Krolewiecki AJ, Albonico M, Degani M, Tais S, Anghoben A, Requena-Mendez A, Muñoz J, Nutman TB, Bisoffi Z. Accuracy of five serologic tests for the follow up of *Strongyloides stercoralis* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e0003491.
- Bisoffi Z, Buonfrate D, Montresor A, Requena-Mendez A, Muñoz J, Krolewiecki AJ, Gotuzzo E, Mena MA, Chiodini PL, Anselmi M, Moreira J, Albonico M. *Strongyloides stercoralis*: a plea for action. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7:e2214.
- Olsen A, van Lieshout L, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, Stothard R, Thybo S, Verweij JJ, Magnussen P. Strongyloidiasis—the most neglected of the neglected tropical diseases? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103:967–72.
- Nutman TB. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. *Parasitology*. 2017;144:263–73.
- Repetto SA, Raybal P, Solana ME, López C, Benini CA, Alba Soto CD, Cappa SM. Comparison between PCR and larvae visualization methods for diagnosis of *Strongyloides stercoralis* out of endemic area: a proposed algorithm. *Acta Trop*. 2016;157:169–77.
- Yap P, Fürst T, Müller I, Krüemer S, Utzinger J, Steinmann P. Determining soil-transmitted helminth infection status and physical fitness of school-aged children. *J Vis Exp*. 2012;66:e3966.
- Llewellyn S, Inpankaew T, Nery SV, Gray DJ, Verweij JJ, Clements AC, Gomes SJ, Traub R, McCarthy JS. Application of a

- multiplex quantitative PCR to assess prevalence and intensity of intestinal parasite infections in a controlled clinical trial. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0004380.
8. Marcos LA, Terashima A, Canales M, Gotuzzo E. Update on strongyloidiasis in the immunocompromised host. *Curr Infect Dis Rep*. 2011;13:35–46.
  9. Verweij JJ, Stensvold CR. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27:371–418.
  10. Nilforoushan MR, Mirhendi H, Rezaie S, Rezaian M, Meamar AR, Kia EB. A DNA-based identification of *Strongyloides stercoralis* isolates from Iran. *Iran J Publ Health*. 2007;36:16–20.
  11. Lodh N, Caro N, Sofer S, Scott A, Krolewiecki A, Shiff C. Diagnóstico de *Strongyloides stercoralis*: Detecção de DNA derivado de parasita na urina. *Acta Trop*. 2016;163:9–13.
  12. Dong L, Yoo HB, Wang J, Park SR. Accurate quantification of supercoiled DNA by digital PCR. *Sci Rep*. 2016;6:24230.
  13. Moghaddasani H, Mirhendi H, Hosseini M, Rokni MB, Mowlavi GH, Kia EB. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection by PCR detection of specific DNA in human stool samples. *Iran J Parasitol*. 2011;6:23–30.
  14. Paula FM, Malta FM, Marques PD, Sitta RB, Pinho JR, Grysczek RCB, Chieffi PP. Molecular diagnosis of strongyloidiasis in tropical areas: a comparison of conventional and real-time polymerase chain reaction with parasitological methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110:272–4.
  15. Ahmad AF, Hadip F, Ngui R, Lim YA, Mahmud R. Serological and molecular detection of *Strongyloides stercoralis* infection among an Orang Asli community in Malaysia. *Parasitol Res*. 2013;112:2811–6.
  16. Zaeter AM, Mohamed Z, Abdullah AD, Mohamad N, Arifin N, Othman N, Noordi R. Detection of *Strongyloides stercoralis* infection among cancer patients in a major hospital in Kelantan, Malaysia. *Singapore Med J*. 2014;55:367–71.
  17. Paula FM, Malta FM, Corral MA, Marques PD, Gottardi M, Meisel DM, Yamashiro J, Pinho JR, Castilho VL, Gonçalves EM, Grysczek RC, Chieffi PP. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection in immunocompromised patients by serological and molecular methods. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2016;58:63.
  18. Hoffmann WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation concentration method in schistosomiasis *mauroi*, Puerto Rico. *J Publ Health Trop Med*. 1934;9:283–91.
  19. Faust EC, Sawitz W, Tobie J, Odon V, Peres C, Lincicome DR. Comparative efficiency of various techniques for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. *J Parasitol*. 1939;25:241–62.
  20. Kato K, Miura M. Comparative examinations. *Jpn J Parasitol*. 1954;3:35.
  21. Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis *mauroi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1972;14:397–400.
  22. Rugai E, Mattos T, Brisola AP. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes: modificações do método de Baermann. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1954;14:5–8.
  23. Costa IN, Sapelete MC, Gonçalves-Pires MRF, Costa-Cruz JM. IgA and IgG antibodies in paired serum and saliva samples in human strongyloidiasis. *Acta Parasitol*. 2003;48:306–11.
  24. Ribeiro VS, Feliciano ND, Gonzaga HT, Costa IN, Gonçalves-Pires MR, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Detergent fraction of heterologous antigen to detect IgA and IgG in strongyloidiasis using saliva and serum paired samples. *Immunol Lett*. 2010;134:69–74.
  25. Machado ER, Ueta MT, Gonçalves-Pires MRF, Alves de Oliveira JB, Faccioli LH, Costa-Cruz JM. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98:849–51.
  26. Verweij JJ, Canales M, Polman K, Ziem J, Brienen EA, Polderman AM, van Lieshout L. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103:342–6.
  27. Dorris M, Viney ME, Blaxter LM. Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. *Int J Parasitol*. 2002;32:1507–17.
  28. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74:5463–7.
  29. Basuni M, Muhi J, Othman N, Verweij JJ, Ahmad M, Mirwan N, Rahumatallah A, Aziz FA, Zainadin NS, Noordin R. A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84:338–43.
  30. Taniuchi M, Verweij JJ, Noor Z, Sobuz SU, van Lieshout L, Petri WA Jr, Haque R, Houpt ER. High throughput multiplex PCR and probe-based detection with Luminex beads for seven intestinal parasites. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84:332–7.
  31. Mendes T, Minor K, Ueta M, Miguel DC, Alegretti SM. Strongyloidiasis current status with emphasis in diagnosis and drug research. *J Parasitol Res*. 2017;2017:5056314.
  32. Gonçalves ALR, Rocha CA, Gonzaga HT, Gonçalves-Pires MRF, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Specific IgG and IgA to larvae, parthenogenetic females and eggs of *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;72:79–84.
  33. Sitta RB, Malta FM, Pinho JR, Chieffi PP, Grysczek RCB, Paula FM. Conventional PCR for molecular diagnosis of human strongyloidiasis. *Parasitology*. 2014;141:716–21.
  34. Bosqui LR, Gonçalves AL, Gonçalves-Pires Mido R, Custodio LA, de Menezes MC, Mium VA, de Paula FM, Pavanelli WR, Conchon-Costa I, Costa-Cruz JM, Costa IN. Detection of parasite-specific IgG and IgA in paired serum and saliva samples for diagnosis of human strongyloidiasis in northern Paraná state, Brazil. *Acta Trop*. 2015;150:190–5.
  35. Siddiqui AA, Berk SL. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin Infect Dis*. 2001;33:1040–7.
  36. Agrawal V, Agarwal T, Ghoshal UC. Intestinal strongyloidiasis: a diagnosis frequently missed in the tropics. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103:242–6.
  37. Uparankaw P, Phongtri S, Morakote N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60:967–73.
  38. Johnston PH, Morris PS, Speare R, McCarthy J, Currie B, Ewald D, Page W, Dempsey K. Strongyloidiasis: a review of the evidence for Australian practitioners. *Aust J Rural Health*. 2005;13:247–54.
  39. Atkins NS, Lindo JF, Lee MG, Conway DJ, Bailey JW, Robinson RD, Bundy DA. Humoral responses in human strongyloidiasis: correlations with infection chronicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997;91:609–13.
  40. Inés EJ, Silva MLS, Souza JN, Teixeira MCA, Soares NM. The role of glycosylated epitopes in the serodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;76:31–5.
  41. Khare R, Espy MJ, Cebelincki E, Bouard D, Sloan LM, Cunningham SA, Pritt BS, Patel R, Binnicker MJ. Comparative evaluation of two commercial multiplex panels for detection of gastrointestinal pathogens by use of clinical stool specimens. *J Clin Microbiol*. 2014;52:3667–73.
  42. Buonfante D, Requena-Mendez A, Anghoben A, Cinquini M, Cnciani M, Pittipalao A, Giorli G, Gobbi F, Piabelli C, Bissoffi Z. Accuracy of molecular biology techniques for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection—a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:e0006229.

△ Adis

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9

Testing for Human Strongyloidiasis

---

43. Boggild AK, Libman M, Greenaway CA, McCarthy AE. CAT-MAT Statement on disseminated strongyloidiasis: prevention, assessment and management guidelines. *Can Commun Dis Rep.* 2016;42:12-9.
44. Jarwan P, Intapan PM, Thanchomng T, Lulitanond V, Ananart W, Maleewong W. Rapid detection of *Opisthorchis viverrini* and *Strongyloides stercoralis* in human fecal samples using a duplex real-time PCR and melting curve analysis. *Parasitol Res.* 2011;109:1593-601.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

1 **4.4. ARTIGO 4**

2  
3  
4 **Clinical profile of patients diagnosed with tuberculosis treated at the**  
5 **University Hospital of Londrina, Paraná**

6  
7 Larissa Rodrigues Bosqui, Suelen Santos Silva, Raquel Arruda Sanfelice,  
8 Milena Mengazzo Miranda-Sapla, Daniele Sapede Alvarenga, Bruno Bevenuto  
9 Lucas, Laís Fernanda Machado, Francine Nesello Melanda, Luiz Antonio  
10 Custodio, Wander Rogerio Pavanelli, Ivete Conchon-Costa, Idessania Nazareth  
11 Costa.

12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21 **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, 2017**

22  
23 QUALIS: B5

24  
25 Volume 38(1), Páginas 89-98.

26  
27 doi.0.5433/1679-0367.2017  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40

## Perfil clínico de pacientes com diagnóstico de tuberculose atendidos no Hospital Universitário de Londrina, Paraná

### *Clinical profile of patients diagnosed with tuberculosis treated at the University Hospital of Londrina, Paraná*

Larissa Rodrigues Bosqui<sup>1</sup>, Suelen Santos Silva<sup>2</sup>, Raquel Arruda Sanfelice<sup>3</sup>, Milena Mengazzo Miranda-Sapla<sup>1</sup>, Daniele Sapede Alvarenga<sup>1</sup>, Bruno Bevenuto Lucas<sup>4</sup>, Laís Fernanda Machado<sup>5</sup>, Francine Nesello Melanda<sup>6</sup>, Luiz Antonio Custodio<sup>7</sup>, Wander Rogerio Pavanelli<sup>8</sup>, Ivete Conchon-Costa<sup>9</sup>, Idessania Nazareth Costa<sup>10</sup>

#### Resumo

O objetivo deste estudo consistiu em analisar o perfil clínico de pacientes positivos para tuberculose através de um estudo epidemiológico, descritivo e retrospectivo, com base em dados secundários contidos em prontuários dos pacientes atendidos no Hospital Universitário de Londrina compreendendo de janeiro de 2010 a dezembro de 2014. Dos prontuários disponíveis para a análise no momento de estudo 86 casos eram positivos para tuberculose, sendo a maioria do sexo masculino (65/76%) com faixa etária compreendida entre 2 e 91 anos. Os principais sinais clínicos apresentados foram tosse (50/58%), febre (45/52%) e perda de peso (34/40%). Em relação à forma clínica, 58/67% dos pacientes apresentaram a forma pulmonar, e 28/33% a forma não pulmonar. Casos positivos para tuberculose em associação com HIV/AIDS corresponderam a 32/37%. Também foram relatados hábitos prejudiciais dos pacientes nos quais 30/34% eram tabagistas, 20/23% usuários de drogas e 14/16% etilistas. Diante da escassez de dados publicados referentes à tuberculose na nossa região e sua relevância para a saúde pública, nosso estudo contribui com os aspectos epidemiológicos principalmente em relação ao elevado número de casos de coinfeção com Vírus da Imunodeficiência Humana e pacientes com evolução a óbito, auxiliando assim, o desenvolvimento e implementação de campanhas ou projetos que visem o diagnóstico e tratamento precoce.

**Palavras chave:** Tuberculose. Saúde pública. Epidemiologia.

<sup>1</sup> Doutoranda em Patologia Experimental pela Universidade Estadual de Londrina. Laboratório de Parasitologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup> Doutorado em Patologia Experimental pela Universidade Estadual de Londrina. Laboratório de Parasitologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>3</sup> Mestrado em Patologia Experimental pela Universidade Estadual de Londrina. Laboratório de Parasitologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>4</sup> Graduando em Odontologia pela Universidade Estadual de Londrina. Laboratório de Parasitologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>5</sup> Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Londrina. Laboratório de Parasitologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>6</sup> Doutoranda em Saúde Coletiva pela Universidade Estadual de Londrina. Laboratório de Parasitologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>7</sup> Doutorado em Patologia Experimental pela Universidade Estadual de Londrina. Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário de Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>8</sup> Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada pela Universidade de São Paulo. Laboratório de Parasitologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>9</sup> Doutorado em Microbiologia pela Universidade Estadual de Londrina. Laboratório de Parasitologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>10</sup> Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas pela Universidade Federal de Uberlândia. Laboratório de Parasitologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

1

Bosqui, L. R. et al.

### Abstract

The objective of this study was to analyze the clinical profile of patients positive for tuberculosis through an epidemiological study, descriptive and retrospective, based on secondary data contained in medical records of patients that attended the Hospital Universitário de Londrina comprising from January 2010 to December 2014. From the medical records available for analysis at the moment of study 86 cases were positive for tuberculosis, being the majority male (65/76%) with age group comprised between 2 to 91 years. The main symptoms presented were cough (50/58%), fever (45/52%) and weight loss (34/40%). Regarding the clinical form, 58/67% of the patients presented the pulmonary form, and 28/33% the non-pulmonary form. Positive cases for tuberculosis in association with HIV/AIDS corresponded to 32/37%. Harmful habits were also reported in patients in which 30/34% were smokers, 20/23% drug users and 14/16% were alcoholics. Against scarcity of published data referring to tuberculosis in our region and its relevance to public health, our study contributes to the epidemiological aspects mainly in relation to the high number of cases of coinfection with Human Immunodeficiency Virus and patients with evolution to death, assisting the development and implementation of campaigns or projects aimed at early diagnosis and treatment.

**Keyword:** Tuberculosis. Public health. Epidemiology.

### Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pela bactéria intracelular *Mycobacterium tuberculosis* ou bacilo de Koch (BK), que afeta prioritariamente os pulmões, embora possa acometer outros órgãos e sistemas (WHO, 2015).

A transmissão da TB é direta e aérea, quase exclusivamente por aerossóis de tosse e a aglomeração de pessoas apresenta-se como o principal fator de transmissão. Má alimentação, falta de higiene, tabagismo, alcoolismo ou qualquer outro fator que gere baixa resistência orgânica, também favorece o estabelecimento da TB (SHETE et al., 2015).

A exposição à *M. tuberculosis* na maioria dos casos é assintomática, podendo causar em alguns pacientes sintomas semelhantes ao de uma gripe. Tosse seca e contínua, posteriormente com secreção e com duração de mais de quatro semanas, sudorese noturna, cansaço excessivo, palidez, falta de apetite e rouquidão são os sintomas da doença. Dificuldade na respiração, eliminação de sangue e acúmulo de pus na pleura pulmonar são característicos em casos mais graves (BRASIL, 2015; SHETE et al., 2015).

A TB é capaz de comprometer mais de um órgão em um mesmo paciente, podendo expressar-se por formas disseminadas como a cutânea aguda disseminada (miliar) ou extrapulmonares. As formas clínicas extrapulmonares são decorrentes da disseminação dos bacilos pela corrente sanguínea e/ou linfática, a partir do foco de inoculação inicial no pulmão, e são classificadas segundo a localização: pleural, ganglionar periférica, osteoarticular, geniturinária

e meningoencefálica (ARORA et al., 2016; SANDGREN; HOLLO; VAN DER WERF, 2013).

Todas essas formas clínicas estão intimamente relacionadas com a resposta imune. A resposta imune tem papel fundamental na defesa contra *M. tuberculosis*, constituindo o principal impedimento para a ocorrência das infecções disseminadas que estão associadas ao elevado índice de mortalidade (O'GARRA et al., 2013). No entanto, a resposta imune contra *M. tuberculosis* é complexa e incompletamente caracterizada, o que dificulta o desenvolvimento de novos testes, vacinas e tratamentos.

Embora seja evidente o papel fundamental das células T CD4<sup>+</sup> juntamente com as citocinas interleucina 12 (IL-12), interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) no controle da infecção por *M. tuberculosis*, ainda não há compreensão exata dos fatores que determinam a resistência de alguns indivíduos frente à infecção por *M. tuberculosis*, enquanto outros são susceptíveis (BINI et al., 2015; CLIFFORD et al., 2015; ETNA et al., 2014; GEORGE et al., 2015; HOSSAIN; NORAZMI, 2013; KASSA et al., 2016; LAI et al., 2013; WU et al., 2017). Entretanto, sabe-se que a imunidade protetora de *M. tuberculosis* pode impedir a multiplicação do bacilo, sem a eliminação completa deste patógeno.

Dados epidemiológicos demonstram que um terço da população mundial está infectada com *M. tuberculosis* e segundo a Organização Mundial de Saúde aproximadamente nove milhões de novos casos de TB foram relatados em 2008 (WHO, 2015).

2  
3  
4  
5  
6  
7  
8

1

Perfil clínico de pacientes com diagnóstico de tuberculose atendidos no Hospital Universitário de Londrina...

Atualmente, o Brasil ocupa a 16ª posição entre os 22 países com maior carga de TB e a 111ª posição em nível de incidência (WHO, 2015). Desta forma, a tuberculose continua sendo a segunda principal causa de morte de doença infecciosa em todo o mundo (AMARE et al., 2015). Segundo Brasil (2014), o Brasil registrou 71.230 novos casos de TB em 2013. A incidência da doença no país foi de 36,7 casos para cada 100 mil habitantes, o que indica queda de 20,3% em relação a 2003, quando a taxa era de 44,4 casos para cada 100 mil pessoas.

No período de 2015 a 2016 houve 3.044 casos de tuberculose confirmados no estado do Paraná. Destes casos, 282 foram notificados na região de Londrina. Neste mesmo período o município de Londrina apresentou 75% dos casos notificados como forma pulmonar e 15% dos casos TB notificados apresentavam coinfeção com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (BRASIL, 2016).

Embora a TB seja uma das maiores causas de mortalidade e morbidade em muitos países, e um problema de saúde de alta relevância, o sucesso no tratamento desta doença é largamente dependente da adesão do paciente ao esquema adotado (BOGAZ, 2016). No Brasil, o esquema terapêutico atual é altamente efetivo com capacidade para curar praticamente todos os casos sendo fornecido gratuitamente pela Rede Pública, através do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (BRASIL, 2015).

Em 1993, a OMS declarou a TB uma emergência mundial, utilizando a estratégia do Tratamento Diretamente Observado (*Directly Observed Treatment, Short-course - DOTS*) para atingir um maior percentual de cura e de detecção dos casos e reduzir o abandono ao tratamento (WHO, 2015).

Esta estratégia foi elaborada com base em cinco elementos fundamentais: detecção dos casos de TB por baciloscopia entre pacientes sintomáticos respiratórios que demandam os serviços gerais de saúde; tratamento padronizado de curta duração, diretamente observável e monitorado em sua evolução; provisão regular de medicamentos; utilização de sistema de registro e informação que assegure a avaliação do tratamento e o compromisso político colocando o controle da TB como prioridade entre as políticas de saúde (EL KAMEL et al., 2015).

Em 1979, o sistema de tratamento preconizado para TB era composto pelo esquema I Rifampicina + Isoniazida + Pirazinamida (RHZ), no entanto, a partir de 2009, foi introduzido o etambutol como quarto

fármaco na fase intensiva de tratamento, devido ao aumento da resistência primária à isoniazida. O esquema básico (RHZE) é indicado para casos novos de tuberculose pulmonar e extrapulmonar (exceto a forma meningoencefálica) de adultos e adolescentes. A apresentação farmacológica desse esquema passa a ser em comprimidos de doses fixas combinadas dos quatro medicamentos (RHZE), nas seguintes dosagens: R 150mg, H 75mg, Z 400mg e E 275mg. Nos casos de recidiva após cura ou retorno após abandono de tratamento, inicia-se o esquema básico, mas é solicitada cultura de escarro e teste de sensibilidade para escolha dos fármacos (BRASIL, 2015).

Nos casos de pacientes que apresentem hepatopatias, efeitos colaterais ao esquema RHZE, ou que fazem uso de imunossupressores ou ainda pacientes com HIV ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), tuberculose meningoencefálica ou que apresentem resistência ao tratamento RHZE, o esquema padronizado é para multirresistência ou esquemas especiais individualizados (BRASIL, 2015).

Diante do aumento da incidência de TB, tanto em regiões tropicais quanto subtropicais, se faz necessário a realização de métodos de ações e buscas envolvendo governos, membros das Nações Unidas e órgãos de comunidade científica que trabalhem arduamente para que a mortalidade referente tanto à tuberculose, quanto à outras infecções associadas ou não a essa doença, como por exemplo, HIV/AIDS, sejam minimizadas (PONCE et al., 2016).

Em virtude da relevância da tuberculose para a saúde pública e diante da escassez de dados publicados referentes ao assunto na nossa região, o nosso objetivo foi analisar o perfil clínico de pacientes positivos para tuberculose e que foram atendidos no Hospital Universitário de Londrina no período de 2010 a 2014.

## Material e Método

Trata-se de um estudo epidemiológico, descritivo, retrospectivo com base de dados secundários contidos em prontuários dos pacientes. A pesquisa foi realizada no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2014, por meio da análise de prontuários de pacientes portadores de tuberculose atendidos no Hospital Universitário de Londrina-PR. Todos os pacientes foram identificados através da busca eletrônica ao sistema do hospital, e incluídos no estudo. Em seguida, os prontuários correspondentes aos números identificados foram localizados e procedeu-se as coletas de dados dos prontuários de pacientes diagnosticados com TB,

2  
3  
4  
5  
6  
7

1

Bosqui, L. R. et al.

principalmente por baciloscopia, cultura e biópsia. No período de janeiro de 2010 a dezembro de 2014 foram registrados eletronicamente 94 casos positivos para tuberculose, sendo 86 prontuários ativos. Outras informações coletadas foram referentes a sexo, idade, aspectos clínicos, tipo de tuberculose diagnosticada (tuberculose pulmonar e não pulmonar), hábitos como tabagismo, uso de álcool e drogas ilícitas, associação com HIV/AIDS, esquema de tratamento e casos de óbitos. Os dados foram catalogados em planilha do programa Excel, e a análise descritiva e representações gráficas foram realizadas por meio de frequências absolutas e relativas utilizando o programa *GraphPad Prism 5*.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, n. 1.306.715.

## Resultados

Dentre os 86 prontuários ativos para acesso no momento da coleta de dados, a frequência observada foi maior para o sexo masculino (65/76%). A faixa etária dos pacientes avaliados variou entre 2 e 91 anos com média de 41,7 e desvio padrão 17,3.

Dentre os sinais clínicos apresentados, os mais frequentes foram tosse (50/58%), febre (45/52%) e perda de peso (34/40%) (Tabela 1).

Em relação ao tipo de TB diagnosticada 58/67% apresentaram a forma clínica pulmonar e 28/33% a forma não pulmonar (Figura 1A).

O número de casos de pacientes positivos para tuberculose em associação com HIV/AIDS correspondeu a 32/37% dos casos (Figura 1B).

Quanto aos hábitos dos pacientes positivos para TB, 30/34% dos pacientes eram tabagistas, 20/23% usuários de drogas e 14/16% eram etilistas (Figura 1C) e os demais (36/27%) não apresentaram hábitos prejudiciais.

Quando verificada a forma clínica dos pacientes que apresentavam a forma não pulmonar foi possível identificar que os locais acometidos com mais frequência foram: ganglionar periférica 8/29%, intestinal 7/25%, sistema nervoso central (SNC) 2/7% e óssea 2/4% (Tabela 2).

Pacientes acometidos em pelo menos dois locais diferentes, classificados como a forma clínica disseminada, apresentavam as seguintes localidades: ganglionar periférica e intestinal 1/4%, ganglionar periférica e sistema nervoso central (SNC) 1/4% e a forma urinária atingindo os rins e bexiga 1/4%. Em

prontuários de dois pacientes não havia informação dos locais de disseminação da doença (Tabela 3).

A forma de tratamento seguiu os padrões estabelecidos pelo programa nacional de tuberculose, com 6/7% dos casos utilizando o esquema I (RHZ), indicado para o tratamento inicial, e 41/48% fizeram uso do esquema I reforçado, que associa o etambutol (E) aos demais medicamentos do esquema I. Alguns pacientes 5/5,8% foram tratados associando-se os dois esquemas (RHZ+RHZE) em momentos diferentes. Outros esquemas utilizando levofloxacina ou clofazimina também foram utilizados (2/2%). Os demais pacientes não tiveram o esquema de tratamento relatado nos prontuários (32/37,2%) (Tabela 4).

Em relação ao número de óbitos, 15/17,4% dos pacientes faleceram durante o tratamento. Dentre esses pacientes, seis possuíam coinfeção HIV/AIDS.

**Tabela 1** - Principais sinais e sintomas relatados em prontuários de pacientes com diagnóstico de tuberculose atendidos no Hospital Universitário de Londrina-PR entre os anos de 2010 e 2014.

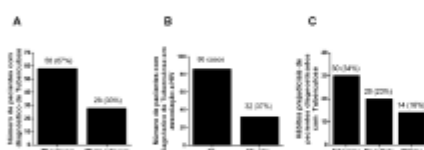
SINAIS E SINTOMAS	N	%
Tosse	50	58
Febre	45	52
Perda de peso	34	40
Sudorese noturna	17	20
Dispneia	15	17
Náuseas e vômitos	14	16
Astenia	13	15
Diarréia	9	10
Anorexia	9	10
Cefaléia	7	8
Dor abdominal	7	8
Hemoptise	5	6
Linfadenomegalia	4	5
Hipertensão	4	5
Disfonia	3	3
Gastrite	3	3
Mialgia	2	2
Dor torácica	2	2
Taquicardia	2	2
Anemia	2	2
Calafrio	1	1
Constipação	1	1
Déficit motor	1	1
Dor de garganta	1	1
Asma	1	1

Fonte: Autores.

1

Perfil clínico de pacientes com diagnóstico de tuberculose atendidos no Hospital Universitário de Londrina...

**Figura 1** - Número de pacientes com diagnóstico de tuberculose (A), diagnóstico de tuberculose e em coinfeção com HIV/AIDS (B) e principais hábitos relatados em prontuários de pacientes com diagnóstico de tuberculose (C). Os dados representam as frequências absolutas e relativas de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Londrina-PR, entre os anos de 2010 e 2014.



Fonte: Autores.

**Tabela 2** - Formas clínicas relatadas em prontuários de pacientes com diagnóstico de tuberculose do tipo não pulmonar atendidos no Hospital Universitário de Londrina-PR entre os anos de 2010 e 2014.

FORMA CLÍNICA NÃO PULMONAR	N	%
Ganglionar periférica	8	29
Intestinal	7	25
Sistema Nervoso Central (SNC)	2	7
Óssea	2	4
Articular	1	4
Pleural	1	4
Cutânea	1	4
Laríngea	1	4

Fonte: Autores.

**Tabela 3** - Formas clínicas disseminadas relatadas em prontuários de pacientes com diagnóstico de tuberculose do tipo não pulmonar atendidos no Hospital Universitário de Londrina-PR entre os anos de 2010 e 2014.

FORMA CLÍNICA DISSEMINADA	N	%
Ganglionar periférica + Intestinal	1	4
Ganglionar periférica + SNC	1	4
Urinária atingindo: Rins + Bexiga	1	4
Disseminada sem relato dos locais	2	7

Fonte: Autores.

**Tabela 4** - Esquemas terapêuticos relatados em prontuários de pacientes com diagnóstico de tuberculose atendidos no Hospital Universitário de Londrina-PR entre os anos de 2010 e 2014.

ESQUEMAS TERAPÊUTICOS	N	%
Rifampicina, isoniazida e pirazinamida (RHZ)	6	7
Etambutol, rifampicina, isoniazida e pirazinamida (RHZE)	41	48
RHZ e posteriormente RHZE	5	6
Levofloxacina	2	1
Clofazimina	2	1
Sem relato	32	37

Fonte: Autores.

## Discussão

Dados epidemiológicos do Paraná e Londrina compreendidos entre os anos de 2010 a 2014 apontam Londrina como a segunda cidade com maior número de casos confirmados de tuberculose no estado. Neste mesmo período a região de Londrina apresentou 836 casos notificados sendo que destes 488 apresentavam confirmação laboratorial (58%), sendo a maioria homens (75%), com faixa etária compreendida de recém-nascidos a maiores de 80 anos e 119 casos (14%) coinfectados com HIV/AIDS (BRASIL, 2016).

A cidade de Londrina conta com diversos níveis de atenção à saúde, inclusive com ambulatorio referência para o tratamento de TB e AIDS. Sendo assim, durante o período de estudo realizado no Hospital Universitário de Londrina estavam disponíveis para a análise 86 prontuários de pacientes com diagnóstico positivo para TB.

Encontramos em nosso estudo predomínio de pacientes do sexo masculino positivos para tuberculose (76%), o que corrobora com os dados notificados no município durante este período (BRASIL, 2016) e também com outros autores que apontam maior acometimento em pacientes do gênero masculino (CHEADE et al., 2009; LEMOS et al., 2012; SANDGREN; HOLLO; VAN DER WERF, 2013). Segundo Lemos et al. (2012) a combinação de fatores responsáveis pela diferença social entre homens e mulheres, decorrentes de distinções comportamentais e culturais podem estar relacionados a este aumento.

Dentre os sinais clínicos relatados nos prontuários analisados, destacam-se a tosse, febre, perda de peso, sudorese noturna, dispnéia, hemoptise, linfadenomegalia, disfonia, dor torácica, anemia, calafrio, déficit motor, dor de garganta e asma estando

2  
3  
4  
5  
6  
7

1

Bosqui, L. R. et al.

presentes no início da infecção e são típicos de doença com acometimento pulmonar (ALARCÓN-ROBAYO et al., 2016). Por outro lado, sinais e sintomas como: náuseas e vômitos, astenia, diarreia, anorexia, cefaleia, dor abdominal, hipertensão, gastrite, mialgia, taquicardia e constipação podem ser gerados como reações adversas aos medicamentos utilizados no tratamento e, portanto, aparecendo após o início da terapêutica (BRASIL, 2015).

Alcântara et al. (2012) realizaram um estudo transversal entre 2008 e 2009 em três unidades de saúde de Fortaleza-CE. Os autores revelaram que anorexia, perda de peso e febre estavam associados à tuberculose pulmonar, ressaltando que a perda de peso poderia ser usada como indicador de TB pulmonar em pacientes com tosse crônica com duração acima de duas semanas.

A perda de peso foi o terceiro (40%) sinal clínico mais apresentado pelos pacientes em nosso levantamento. Deficiências de micronutrientes, em especial, vitaminas e minerais são importantes no metabolismo, na função celular e defesa contra tuberculose (BHARGAVA et al, 2014; HAYASHI et al., 2014; KANT; GUPTA; AHLUWALLA, 2015; TANG; YAM; CHEN, 2016; WHO, 2013). O conhecimento dos efeitos de micronutrientes e suas interações com tuberculose/HIV é de grande importância nas estratégias abrangentes de planejamento para promover a saúde através da nutrição e para aumentar a eficácia da terapia específica (AMARE et al., 2015).

Nossa análise apontou que dos 86 casos de tuberculose, 28 casos foram de tuberculose não pulmonar, correspondendo a 33%. Segundo Yasui (2014), a maioria dos casos de adultos com tuberculose secundária não pulmonar é induzida por reativação endógena, quando os bacilos se multiplicam rapidamente por falha do controle imunológico do hospedeiro. Fatores como desnutrição, envelhecimento, dosagem de medicamento imunossupressor e infecção por HIV podem estar envolvidos nessa ativação (RODRIGUES; FIEGENBAUM; MARTINS, 2010).

Dentre os casos analisados foi possível observar que pacientes que apresentavam formas clínicas do tipo não pulmonar eram acometidos principalmente nos gânglios, intestino, sistema nervoso central e ossos. Além disso, cinco pacientes foram acometidos em mais de uma região sem contar a região pulmonar e pleural, sendo estes considerados em condição de tuberculose disseminada.

Outras aspectos evidenciam que um número considerável de pacientes apresentavam hábitos nocivos como o tabagismo e alcoolismo, o que os tornam mais susceptíveis à infecção por tuberculose. O mesmo pode ser observado em estudo realizado no município de Londrina-PR, nos anos de 2001 a 2008, onde se observou que dentre os agravos comumente associados à tuberculose, AIDS e o alcoolismo foram os mais frequentes (COSTA JUNIOR, 2011).

Os dados analisados neste estudo apontaram 32 casos positivos para tuberculose/HIV com idade entre 24 e 59 anos, padrão semelhante aos casos relatados anteriormente na literatura, onde demais autores identificaram que a faixa etária predominante nos casos de tuberculose/HIV ocorre em jovens adultos, compondo uma parcela significativa da população economicamente ativa (CHEADE et al., 2009; LEMOS et al., 2012; SANDGREN; HOLLO; VAN DER WERF, 2013). No Brasil, a faixa etária dos indivíduos mais atingidos pela tuberculose compreende dos 20 aos 49 anos, abrangendo em torno de 63% dos casos novos da doença registrados em 2009. Uma das possíveis explicações para a elevada frequência da coinfeção em jovens adultos relaciona-se aos hábitos adotados por estes, uma vez que estão mais expostos ao *M. tuberculosis* e ao HIV (LEMOS et al., 2012; RODRIGUES; FIEGENBAUM; MARTINS, 2010).

O teste rápido para HIV é uma recomendação do Ministério da Saúde voltada para todos os pacientes com tuberculose, isso se deve ao fato de as pessoas com HIV estarem mais propensas a desenvolver a tuberculose ativa em comparação à população geral, sendo frequente o diagnóstico da infecção pelo HIV ocorrer durante o curso da tuberculose (BRASIL, 2013). Estas recomendações são principalmente porque dentre as doenças que são consideradas as principais responsáveis pela situação de calamidade pública e econômica mundial estão a tuberculose, AIDS e a malária. Más condições socioeconômicas contribuem para maior vulnerabilidade da população às doenças infectocontagiosas, principalmente pela desnutrição, a falta de acesso aos serviços de saúde e meios de prevenção. Além disso, essas doenças podem interferir no desenvolvimento econômico desses países por acometer a população economicamente ativa (DI GENNARO et al., 2017).

A imunodepressão em pacientes coinfectados com tuberculose/HIV é uma das causas mais frequentes de morte (TRINH et al., 2016). Nossos achados (n=6/40%) demonstram a grave relação entre as duas morbidades,

2  
3  
4  
5  
6  
7  
8

1

Perfil clínico de pacientes com diagnóstico de tuberculose atendidos no Hospital Universitário de Londrina...

indo de encontro com demais estudos, onde relataram que os pacientes com TB também tiveram uma progressão mais rápida para infecções oportunistas associadas à AIDS, sugerindo que os mecanismos para este aumento da mortalidade foi devido ao déficit da imunidade (KABALI et al., 2013). A infecção por HIV envolve mecanismos que conduzem à reativação de *M. tuberculosis* nesses pacientes. O vírus é capaz de alterar a função das células T CD4<sup>+</sup> que coordenam a defesa imunológica contra vírus e bactérias, aumentando assim em 20 vezes a probabilidade de conversão de TB latente em tuberculose ativa, que é uma das principais causas de morte em indivíduos acometidos pela AIDS (LEMOIS et al., 2012).

Com o objetivo de controlar a doença, a Organização Mundial de Saúde recomenda o tratamento completo em, no mínimo, 85% dos casos diagnosticados. Para que isso seja possível, é necessária uma rede de serviços bem organizada e gerenciada, além de informações de qualidade que são fundamentais para a implementação dessa estratégia. Neste contexto, o Hospital Universitário de Londrina é referência à nível terciário para o tratamento de tuberculose, e apresenta-se como um dos municípios prioritários de acordo com o Programa Nacional de Controle da Tuberculose (BRASIL, 2014).

Em estudo retrospectivo, Seiscento (2012) demonstrou que o tratamento da tuberculose em pacientes imunossuprimidos (infecção pelo HIV, diabetes e insuficiência renal) pode causar diversos efeitos colaterais como insuficiência renal e outras doenças pulmonares. No entanto, o autor ressalta a importância de um monitoramento do paciente durante o tratamento devido aos efeitos colaterais das drogas antituberculoze. Visando isso, profissionais de Unidades de Atenção Básica são capacitados para o aconselhamento e a execução de testes rápidos anti-HIV e de testes tuberculínicos, seguindo a orientação de descentralizar e agilizar o diagnóstico de coinfeção tuberculose/HIV e, da mesma forma, o tratamento da tuberculose latente (SEISCENTO, 2012). Entretanto, muitos pacientes não aderem ao tratamento ou abandonam após um período.

Diante das precárias condições socioeconômicas, o controle da tuberculose permanece um desafio. A desnutrição, a falta de acesso e recursos fornecidos aos serviços públicos de saúde contribui para a vulnerabilidade da população e para a prevalência de doenças infectocontagiosas. Em âmbito global, a infecção pelo HIV tem modificado a tendência

epidemiológica da tuberculose, principalmente em países onde há índices elevados da doença (KWAN; ERNST, 2011; TANG; YAM; CHEN, 2016). Apesar do Brasil ter apresentado uma diminuição no coeficiente de incidência de TB, existem desafios para a redução do número de casos da doença, visto que o país ainda registra cerca de 73 mil casos novos por ano.

Sendo assim, são de grande responsabilidade a investigação e a prevenção da tuberculose, exigindo maior atenção dos profissionais e órgãos competentes, uma vez que representa um problema grave para a saúde pública. Isso porque, os aspectos decorrentes da baixa suspeição da doença e do atraso na solicitação do exame de baciloscopia de escarro, podem prejudicar o diagnóstico precoce (PONCE et al., 2016)

No intuito de se diagnosticar rapidamente, diminuindo números de pessoas infectadas e consequentemente número de óbitos, um teste inovador para a identificação rápida da tuberculose é oferecido no Sistema Único de Saúde. No exame de baciloscopia do escarro, o resultado leva 24 horas e outros 60 dias para a análise da cultura de identificação de micobactérias. O teste *GeneXpert* é totalmente automatizado, identificando-se fragmentos do DNA da micobactéria no escarro dentro de duas horas e com risco mínimo de contaminação (BRASIL, 2014).

Nosso estudo apresenta a importância da TB em diversos aspectos e aponta dados que permitem maiores esclarecimentos sobre o assunto, principalmente em relação ao elevado número de casos de coinfeção com HIV e pacientes com evolução à óbito em nossa região, contribuindo assim, para o desenvolvimento e implementação de campanhas ou projetos que visem o diagnóstico e tratamento precoce, proporcionando a melhoria da qualidade de vida e cura dos pacientes portadores de TB.

#### Agradecimentos

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade Estadual de Londrina (UEL).

#### Referências

ALARCÓN-ROBAYO, J. F.; MARTINEZ-CASALLAS, L.; SAMIR-SÁNCHEZ, M.; VALDERRAMA-MENDOZA, J. S.; DIEGO BADOS-ENRIQUEZ, M.; JIMÉNEZ-CANIZALES, C. E. Prevalencia de tuberculosis pulmonar en población privada de la libertad de 10 centros penitenciarios en Colombia, 2013. Aug. 2016. Disponível em: <<https://www>

2  
3  
4  
5  
6  
7

1

Bosqui, L. R. et al.

- researchgate.net/publication/313979214\_Prevalencia\_de\_tuberculosis\_pulmonar\_en\_poblacion\_privada\_de\_la\_libertad\_de\_10\_centros\_penitenciarios\_en\_Colombia\_2013>. Acesso em: 11 set. 2016.
- ALCANTARA, C. C. S.; KRITSKI, A. L.; FERREIRA, V. G.; FAÇANHA, M. C.; PONTES, R. S.; MOTA, R. S.; LEITÃO, T. M. J. S. Fatores associados à tuberculose pulmonar em pacientes que procuraram serviços de saúde de referência para tuberculose. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 622-629, 2012.
- AMARE, B.; MOGES, B.; MULU, A.; YIFRU, S.; KASSU, A. Quadruple burden of HIV/AIDS, tuberculosis, chronic intestinal parasitoses, and multiple micronutrient deficiency in ethiopia: a summary of available findings. *BioMed Research International*, New York, v. 2015, 2015.
- ARORA, R.; ARMITIGE, L.; WANGER, A.; HUNTER, R. L.; HWANG, S. A. Association of pellicle growth morphological characteristics and clinical presentation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Tuberculosis*, Edinburgh, v. 101, p. S63-S68, 2016.
- BHARGAVA, A.; BENEDETTI, A.; OXLADE, O.; PAI, M.; MENZIES, D. Undernutrition and the incidence of tuberculosis in India: national and subnational estimates of the population-attributable fraction related to undernutrition. *The National Medical Journal of India*, New Delhi, v. 27, n. 3, p. 128-133, 2014.
- BINI, E. I.; D'ATTILIO, L.; MARQUINA-CASTILLO, B.; MATA-ESPINOSA, D.; DÍAZ, A.; MARQUEZ-VELASCO, R.; GAMBOA-DOMÍNGUEZ, A.; BAY, M. L.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; BOTTASSO, O. The implication of pro-inflammatory cytokines in the impaired production of gonadal androgens by patients with pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*, Edinburgh, v. 95, n. 6, p. 701-706, 2015.
- BOGAZ, C. *Incidência da tuberculose cat 20,2% no Brasil em uma década*. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/22736-incidencia-da-tuberculose-cat-20-2-no-brasil-em-uma-decada>>. Acesso em: 11 set. 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Detectar, tratar e curar: desafios e estratégias brasileiras frente à tuberculose*. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Panorama da tuberculose no Brasil: indicadores epidemiológicos e operacionais*. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Recomendações para o manejo da coinfeção TB-HIV em serviços de atenção especializada a pessoas vivendo com HIV/aids*. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Sistema de Informação de agravos de notificação (SINAN)*. 2016. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/tdex.php?area=0203&td=31009407&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?stnannet/cnv/tuberc>>. Acesso em: 18 mar. 2017.
- CHEADE, M. F. M.; IVO, M. L.; SIQUEIRA, P. H.; SÁ, R. G.; HONER, M. R. Characterization of tuberculosis among HIV/AIDS patients at a referral center in Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 42, n. 2, p. 119-125, 2009.
- CLIFFORD, V.; ZUFFEREY, C.; STREET, A.; DENHOLM, J.; TEBRUEGGE, M.; CURTIS, N. Cytokines for monitoring anti-tuberculous therapy: a systematic review. *Tuberculosis*, Edinburgh, v. 95, n. 3, p. 217-228, 2015.
- COSTA JUNIOR, W. L. *Avaliação dos casos de tuberculose notificados no município de Londrina no período de 2001 a 2008*. 2011. 51 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Gestão de Serviços de Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.
- DI GENNARO, F.; PIZZOL, D.; CEBOLA, B.; STUBBS, B.; MONNO, L.; SARACINO, A.; LUCHINI, C.; SOLMI, M.; SEGAFREDO, G.; PUTOTO, G.; VERONESE, N. Social determinants of therapy failure and multi drug resistance among people with tuberculosis: A review. *Tuberculosis*, Edinburgh, v. 103, p. 44-51, 2017.
- EL KAMEL, A.; JOOBEUR, S.; SKHIRI, N.; MHAMED, S. C.; MRIBAH, H.; ROUATBI, N. Fight against tuberculosis in the world. *Revue De Pneumologie Clinique*, Paris, v. 71, n. 2-3, p. 181-187, 2015.
- ETNA, M. P.; GIACOMINI, E.; SEVERA, M.; COCCIA, E. M. Pro-and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: a two-edged sword in TB pathogenesis. *Seminars in Immunology*, Philadelphia, v. 26, n. 6, p. 543-551, 2014.
- GEORGE, P. J.; KUMAR, N. P.; JAGANATHAN, J.; DOLLA, C.; KUMARAN, P.; NAIR, D.; BANUREKHA, V. V.; SHEN, K.; NUTMAN, T. B.; BABU, S. Modulation of pro-and anti-inflammatory cytokines in active and latent tuberculosis by coexistent *Strongyloides stercoralis* infection. *Tuberculosis*, Edinburgh, v. 95, n. 6, p. 822-828, 2015.
- HAYASHI, S.; TAKEUCHI, M.; HATSUDA, K.; OGATA, K.; KURATA, M.; NAKAYAMA, T.; OHISHI, T.; NAKAMURA, H. The impact of nutrition and

2  
3  
4  
5  
6  
7

1

Perfil clínico de pacientes com diagnóstico de tuberculose atendidos no Hospital Universitário de Londrina...

- glucose intolerance on the development of tuberculosis in Japan. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, Paris, v. 18, n. 1, p. 84-88, 2014.
- HOSSAIN, M. M.; NORAZMI, M. N. Pattern recognition receptors and cytokines in Mycobacterium tuberculosis infection - the double-edge sword? *BioMed Research International*, New York, 2013, 2013.
- KABALI, C.; MTEI, L.; BROOKS, D. R.; WADDELL, R.; BAKARI, M.; MATEE, M.; ARBEIT, R. D.; PALLANGYO, K.; HORSBURGH, C. R. Increased mortality associated with treated active tuberculosis in HIV-infected adults in Tanzania. *Tuberculosis*, Edinburgh, v. 93, n. 4, p. 461-466, 2013.
- KANT, S.; GUPTA, H.; AHLUWALIA S. Significance of nutrition in pulmonary tuberculosis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v. 55, n. 7, p. 955-963, 2015.
- KASSA, D.; DE JAGER, W.; GEBREMICHAEL, G.; ALEMAYEHU, Y.; RAN, L.; FRANSEN, J.; WOLDAY, D.; MESSELE, T.; TEGBARU, B.; OTTENHOFF, T. H. M.; VAN BAARLE, D. The effect of HIV coinfection, HAART and TB treatment on cytokine/chemokine responses to *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) antigens in active TB patients and latently Mtb infected individuals. *Tuberculosis*, Edinburgh, v. 96, p. 131-140, 2016.
- KWAN, C. K.; ERNST, J. D. HIV and tuberculosis: a deadly human syndemic. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 24, n. 2, p. 351-376, 2011.
- LAI, R. P.; NAKIWALA, J. K.; MEINTJES, G.; WILKINSON, R. J. The immunopathogenesis of the HIV tuberculosis immune reconstitution inflammatory syndrome. *European Journal of Immunology*, Weinheim, v. 43, n. 8, p. 1995-2002, 2013.
- LEMOS, L. A.; FEIJÃO, A. R.; GIR, E.; GALVÃO, M. T. G. Aspectos da qualidade de vida de pacientes com infecção HIV/tuberculose. *Acta Paulista de Enfermagem*, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 41-47, 2012.
- O'GARRA, A.; REDFORD, P. S.; MCNAB, F. W.; BLOOM, C. I.; WILKINSON, R. J.; BERRY, M. P. The immune response in tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, Palo Alto, v. 31, p. 475-527, 2013.
- PONCE, M. A. Z.; WYSOCKI, A. D.; ARAKAWA, T.; ANDRADE, R. P.; VENDRAMINI, S. H. F.; SILVA SOBRINHO, R. A.; MONROE, A. A.; RUFFINO NETTO, A.; VILLA, T. C. S. Atraso do diagnóstico da tuberculose em adultos em um município paulista em 2009: estudo transversal. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, Brasília, v. 25, n. 3, p. 553-562, 2016.
- RODRIGUES, J. L. C.; FIEGENBAUM, M.; MARTINS, A. F. Prevalence of tuberculosis/HIV coinfection in patients from Model Health Centre in Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Scientia Medica*, Porto Alegre, v. 20, n. 3, p. 212-217, 2010.
- SANDGREN, A.; HOLLO, V.; VAN DER WERF, M. J. Extrapulmonary tuberculosis in the European Union and European Economic Area, 2002 to 2011. *Euro Surveillance*, Sweden, v. 18, n. 12, p. 1-9, 2013.
- SEISCENTO, M. Tuberculosis in special settings: HIV, diabetes mellitus and renal failure. *Pulmão*, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 23-26, 2012.
- SHETE, P. B.; HAGUMA, P.; MILLER, C. R.; OCHOM, E.; AYAKAKA, I.; DAVIS, J. L.; DOWDY, D. W.; HOPEWELL, P.; KATAMBA, A.; CATTAMANCHI, A. Pathways and costs of care for patients with tuberculosis symptoms in rural Uganda. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, Paris, v. 19, n. 8, p. 912-917, 2015.
- TANG, J.; YAM, W. C.; CHEN, Z. *Mycobacterium tuberculosis* infection and vaccine development. *Tuberculosis*, Edinburgh, v. 98, p. 30-41, 2016.
- TRINH, Q. M.; NGUYEN, H. L.; DO, T. N.; NGUYEN, V. N.; NGUYEN, B. H.; NGUYEN, T. V.; SINTCHENKO, V.; MARAIS, B. J. Tuberculosis and HIV co-infection in Vietnam. *International Journal of Infectious Diseases*, Brookline, v. 46, p. 56-60, 2016.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global tuberculosis report 2015*. Geneva, 2015.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tuberculosis. *Saudi Medical Journal*, Riyadh, v. 34, n. 11, p. 1205e7, 2013.
- WU, J.; WANG, S.; LU, C.; SHAO, L.; GAO, Y.; ZHOU, Z.; HUANG, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, W. Multiple cytokine responses in discriminating between active tuberculosis and latent tuberculosis infection. *Tuberculosis*, Edinburgh, v. 102, p. 68-75, 2017.
- YASUI, K. Immunity against *Mycobacterium tuberculosis* and the risk of biologic anti-TNF- $\alpha$  reagents. *Pediatric Rheumatology*, Brussels, v. 12, n. 1, p. 45, 2014.

Recebido em: 06 out. 2016

Aceito em: 06 mar. 2017

97

2  
3  
4  
5  
6  
7

1  
2 **4.5. ARTIGO 5**

3  
4 **Perfil do complexo imune IgA, IgG e IgG específico para Strongyloides em**  
5 **pacientes com tuberculose pulmonar**

6  
7  
8 Larissa Rodrigues Bosqui, Gabriela Borges da Silva, Henrique Tomaz Gonzaga,  
9 Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves, Luiz Antonio Custodio, Wander Rogério Pavanelli,  
10 Ivete Conchon-Costa, Fabiana Martins de Paula, Julia Maria Costa-Cruz, Idessania  
11 Nazareth Costa

12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21 **\*Será submetido para:** *Journal of Oral Pathology & Medicine*

22  
23 QUALIS: B1

24  
25 F.I: 2.23  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

1  
2 ***Strongyloides*-specific IgA, IgG and IgG immune complex profile in patients with**  
3 **pulmonary tuberculosis**  
4

5 Larissa Rodrigues Bosqui\*, Gabriela Borges da Silva\*, Henrique Tomaz Gonzaga, Ana  
6 Lúcia Ribeiro Gonçalves, Luiz Antonio Custodio, Wander Rogério Pavanelli, Ivete  
7 Conchon-Costa, Fabiana Martins de Paula, Julia Maria Costa-Cruz, Idessania Nazareth da  
8 Costa  
9

10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21 \* LRB e GBS contribuíram igualmente

22 **Correspondence:**

23 Idessania Nazareth da Costa

24 Departamento de Ciências Patológicas, CCB,

25 Laboratório de Parasitologia Experimental,

26 Universidade Estadual de Londrina,

27 Rodovia Celso Garcia Cid Campus Universitário, Londrina, PR

28 CEP 86051-990, Brazil

29 (e-mail: idessania@hotmail.com)  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

1  
2 **Abstract**  
3

4 Coinfection between tuberculosis and strongyloidiasis is significant to public health given  
5 that the two diseases have a high incidence and present coincident vulnerable populations. In  
6 light of the increase in tuberculosis in tropical and subtropical regions, which are areas with  
7 a high prevalence of helminthiases, especially strongyloidiasis, the aim was to describe an  
8 anti-strongyloides IgA, IgG, and IgG immune complex antibody response profile in patients  
9 with pulmonary tuberculosis (TB). Samples were collected from 100 individuals: group I,  
10 with 50 healthy individuals; and group II, with 50 TB patients. The IgA, IgG, and IgG-IC  
11 detection was carried out via an ELISA immunoenzymatic test, using alkaline extract from  
12 *S. venezuelensis* larvae as an antigen. The area under the ROC curve and diagnostic  
13 parameters were calculated. The IgA detection in the saliva was 34% in group I and 66% in  
14 group II ( $p<0.05$ ). IgG was detected in 46% of the saliva samples of group I and 52% of  
15 group II. For IgG-IC, 38% were positive in group I and 68% were in group II ( $p<0.05$ ). In  
16 the serum there was 36% positivity for IgA in group I and 60% in group II ( $p<0.05$ ). In  
17 relation to the IgG detection, group I showed 46% positivity and group II showed 58%. For  
18 this serum IgG-IC detection, it was 34% in group I and 68% in group II ( $p<0.05$ ). This is a  
19 pioneering study that presents promising results and an innovative proposal for the use of  
20 saliva samples, especially for IgG immune complex detection in patients with TB.

21  
22 **Keywords:** immunodiagnosis, saliva, immune complex, tuberculosis, strongyloidiasis.  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

## 1 INTRODUCTION

Epidemiological data show that one third of the global population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* and 10.4 million people in the world fell ill to tuberculosis in 2016, 1.3 million of which died as a result of the disease.<sup>1</sup> Immune response is fundamental in the defense against *M. tuberculosis*, constituting the main barrier to the occurrence of the disseminated infections associated with the high mortality rate.<sup>2</sup> The immune response against *M. tuberculosis* is complex and not fully characterized, which makes the development of new tests, vaccines, and treatments difficult.

Despite few reports in the literature, coinfection between tuberculosis and strongyloidiasis, an infection caused by the *Strongyloides stercoralis* helminth, is relevant to public health, given that both diseases present a high incidence and coincident vulnerable populations.<sup>3,4,5</sup>

During the course of coinfection, the immune response is closely linked with the negative modulation of the humoral response against *M. tuberculosis* antigens,<sup>6,7</sup> thus precise diagnosis of strongyloidiasis can avoid cases of morbidity and mortality. Immunodiagnosis of strongyloidiasis using saliva samples<sup>8,9</sup> can effectively contribute to the early detection of this infection so as to avoid cases of coinfection.

The last few years have seen an increase in research using specific salivary antibodies, which are useful in epidemiology and toxicology,<sup>8,10</sup> demonstrating the importance of saliva in diagnosing protozoan infections<sup>11,12,13</sup> and helminthiases, such as *S. stercoralis*.<sup>8,14,15</sup> Besides antibodies, the infectious diseases promote the formation of antigen-antibody immune complexes. These immune complexes are important in diagnosis, since they can also be used in screening for the disease;<sup>9,16,17</sup> however, there are no reports on the detection of immune complexes in saliva samples derived from individuals with pulmonary tuberculosis and coinfecting with *S. stercoralis*.

In light of the gravity caused by coinfection between strongyloidiasis and TB, and the high mortality rate involved, the use of immunodiagnosis may contribute to a quick and effective diagnosis, enabling the early treatment of individuals and minimizing the harm caused by this coinfection. Thus, our aim was to carry out the detection of IgA, IgG, and

1 IgG immune complex in paired samples of serum and saliva for diagnosing strongyloidiasis  
2 in patients with pulmonary tuberculosis.

## 3 **2 MATERIALS AND METHODS**

### 4 **2.1. Ethical considerations and recruitment of individuals**

5 The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the State  
6 University of Londrina (decision number 1,306,715), in the State of Paraná, Brazil. Paired  
7 samples of feces, serum, and saliva were obtained from patients in treatment at the Dr.  
8 Bruno Piancastelli Filho Center of Reference for Tuberculosis of the city of Londrina. And  
9 the apparently healthy controls were obtained voluntarily from students at the State  
10 University of Londrina.

### 12 **4.3. Study group and samples**

13 Biological samples were collected from 100 individuals and divided into two groups:  
14 group I, with 50 apparently healthy individuals based on clinical observation of them, with  
15 no evidence of contact with *S. stercoralis* infection and no previous history; and group I,  
16 with 50 patients in treatment for pulmonary tuberculosis.

17 Fecal samples were analyzed in accordance with Hoffmann et al.,<sup>18</sup> Rugai et al.<sup>19</sup>,  
18 and the agar plate culture method.<sup>20</sup> Serum samples obtained from the blood were stored at -  
19 20°C until use. Unstimulated saliva samples were collected with the help of clean cotton  
20 buds and after washing the oral cavity with water; the samples were distributed into aliquots  
21 and conserved until use, when they were slowly thawed and centrifuged at 12,400 x g for 15  
22 min.

### 24 **2.3. Obtainment of *S. venezuelensis* filaroid larvae**

25 Third stage (L3) infectious *Strongyloides venezuelensis* larvae were obtained from  
26 carbon cultures of feces of mice (*Rattus norvegicus* of the Wistar line) experimentally  
27 infected and retrieved by Rugai et al.<sup>19</sup> The larvae were washed five times in a phosphate  
28 buffered saline solution (PBS, 0.01 mol/L, pH 7.2) and stored at -20°C in PBS until use in  
29 the antigenic preparation.

### 31 **2.4. Alkaline extract from L3 *S. venezuelensis* larvae**

1           The alkaline extract was prepared in accordance with Machado et al.,<sup>21</sup> with  
2 modifications. Approximately 300,000 *S. venezuelensis* filariform larvae were used.  
3 1 mL of NaOH (sodium hydroxide) 0.15 M with protease inhibitors was added to the tube  
4 containing the solution resulting from the larvae break-up (5 freeze-thaw cycles using liquid  
5 nitrogen with maceration), and this preparation remained at rest for 2h at 4°C under  
6 agitation. Subsequently, 0.5 mL of HCl (chloric acid) 0.3M was added to the solution to  
7 achieve a neutral pH (7.0) and the mixture was centrifuged at 10,000 x g for 30 min at 4°C.  
8 The supernatant (alkaline extract) was analyzed with regards to protein content as according  
9 to Lowry,<sup>22</sup> divided into aliquots, and stored at -20°C until use.

10

## 11 **2.5. IgA and IgG detection using the ELISA method**

12           Preliminary experiments were carried out to determine optimal conditions for titration  
13 of reagents via ELISA (antigenic extract, serum and saliva samples, controls, and  
14 conjugate). Briefly, low-affinity microplates (Olen, São José dos Pinhais, PR, Brazil) were  
15 incubated for 18h at 4°C with 5µg/mL of alkaline extract from *S. venezuelensis* in 0.06  
16 mol/L carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6). The plates were washed three times with PBS  
17 containing Tween 20 at 0.05% and blocking was carried out for 30 min at 37°C with  
18 PBSTM 3%. Subsequently, the plates were incubated with saliva samples (50 µL/well) with  
19 a 1:2 dilution (IgA and IgG detection) and incubated for 45 min at 37°C. The serum  
20 samples (50 µL/well) were diluted to 1:20 (IgA detection) or 1:80 (IgG detection). All the  
21 biological samples were tested in duplicates. Human anti-IgA goat antibody (Sigma, St  
22 Louis, MO, USA) marked with peroxidase was added to the plate, in a 1:500 dilution for the  
23 saliva sample and 1:1000 dilution for the serum sample, as well as human anti-IgG goat  
24 secondary antibody (Sigma, St Louis, MO, USA) conjugated with peroxidase in a 1:5000  
25 dilution for the saliva sample and 1:10,000 for the serum sample, for a final sample volume  
26 of 50 µL/well. These were incubated for 45 min at 37°C. The reaction was revealed by the  
27 addition of 50 µL of a mixture containing 0.05 µg of o-phenylenediamine (Sigma-Aldrich  
28 Co., St. Louis, USA) and 5 µL of 30% hydrogen peroxide (Merck, Rio de Janeiro, Brazil) in  
29 12.5 mL of citrate-phosphate buffer (0.1 M, pH 5.5). The plates were incubated for 15 min  
30 at ambient temperature. The reaction was paired by the addition of 25 µL/well of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N  
31 (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil). The optical density (OD) was determined at 492 nm using an

1 Epoch™ plate reader (BioTekInstruments, Inc., Winooski, VT, USA). The results were  
2 expressed as an ELISA index (EI), where the cut-off value was calculated by the ROC curve  
3 (operational characteristic of the receptor).

## 4 5 **2.6. IgG immune complex detection in saliva and serum samples**

6  
7 Preliminary experiments were carried out to determine the optimal conditions for  
8 ELISA using the serial dilution of the reagents (antibody, saliva and serum, control, and  
9 conjugate). High-affinity polystyrene microtitration plates (Costar, CorningIncorp., NY,  
10 USA) were coated for 18 h at 4°C with 50 µL/well of IgG obtained from rabbits immunized  
11 (40 µg/mL)<sup>23</sup> in a 0.06 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6). After three washes with  
12 PBST, 50 µL/well of (pure) saliva or (1:80) serum samples were added and incubated for 45  
13 min at 37°C. All the biological samples were tested in duplicate. The positive samples for  
14 anti-*S. venezuelensis*, both in the saliva and in the serum, were used as a control. After  
15 incubation and another three washes, human anti-IgG goat antibody marked with peroxidase  
16 (Sigma, St Louis, MO, USA) (50 µL/well) was added in a 1:5000 dilution for the saliva  
17 sample and 1:10,000 for the serum, for 45 min at 37°C. The reaction was revealed as  
18 described in the item above.

## 19 20 **2.7. Statistical analysis**

21 The analyses were carried out using the GraphPadPrism software version 5.0. The  
22 cut-off, for each ELISA reaction condition, was established using a ROC (receiver operating  
23 characteristic) curve, which provided the diagnostic parameter of the area under the ROC  
24 curve (AUC), sensitivity and specificity.<sup>24</sup> The ELISA index (EI), used for presenting the  
25 data, was obtained by the ratio between the DO and the chosen cut-off and EI values >1.0  
26 were considered positive. The data were verified regarding the distribution pattern and the  
27 comparison between the groups was made using unpaired t tests or the Mann-Whitney test.  
28 Probability values (P) <0.05 were considered significant.

## 29 30 **3 RESULTS**

1 In the coprological diagnosis, two individuals (4%) were observed to be positive for  
2 *S. stercoralis* in group II (patients with pulmonary tuberculosis).

3 The IgA, IgG, and IgG immune complex (IgG-IC) antibodies detection in the saliva  
4 samples is illustrated in Figure 1A. The analysis of the saliva samples in group I (negative  
5 control) showed 34% (n=17) for IgA, 46% (n=23) for IgG, and 38% (n=19) for anti-*S.*  
6 *stercoralis* IgG-IC. In group II (patients with pulmonary tuberculosis), 66% (n=33) of the  
7 samples were positive for IgA, 52% (n=26) were for IgG, and 62% (n=31) were for IgG-IC.  
8 The median of the EI in the detection of IgA in the saliva was higher for group II ( $M = 1.74$   
9  $\times 0.74$ ;  $U = 803.5$ ,  $P = 0.0021$ ). The IgG test, with saliva samples, did not show any  
10 difference between the groups tested. The patients with tuberculosis (group II) presented a  
11 higher EI for IgG-IC in comparison with the healthy ones (group I;  $M = 1.44 \times 0.69$ ;  $U =$   
12  $713.0$ ,  $P = 0.0002$ ).

13 Figure 1B shows the positivity for IgA, IgG, and IC-IgG in the serum samples. In  
14 group I, 36% (n=18) of the individuals were positive for IgA, 46% (n=23) were for IgG, and  
15 34% (n=17) were for IgG-IC. In group II, 60% (n=30) of the patients were positive for IgA,  
16 58% (n=29) were for IgG, and 68% (n=34) were for IgG-IC. The patients with tuberculosis  
17 presented the same profile of difference observed in the saliva and in the serum; that is,  
18 higher values for IgA ( $M = 1.03 \times 0.82$ ;  $U = 861.5$ ,  $P = 0.0075$ ) and IgG-IC ( $x = 1.29 \times 0.84$ ;  
19  $t = 5.596$ ;  $P < 0.0001$ ).

20 The sensitivity (Se), specificity (Sp), and area under the ROC curve (AUC) in the  
21 serum and saliva samples for anti-*Strongyloides* IgA, IgG, and IC-IgG detection are shown  
22 in Table 1.

#### 24 4 DISCUSSION

25 Global pathogens, such as human immunodeficiency virus (HIV), species of  
26 *Plasmodium* spp., and *M. tuberculosis*, may be present in the geographical distribution due  
27 to coinfection with helminths.<sup>3</sup> According to the WHO (2017), unsanitary conditions are  
28 directly associated with the high incidence of tuberculosis and intestinal infections,  
29 especially among low income populations.<sup>1</sup> However, the data on reports of parasitic  
30 infections are still underestimated.<sup>25,26</sup>

1 Infection caused by *S. stercoralis* is generally asymptomatic; however, in serious  
2 cases, cases of pulmonary edema and respiratory insufficiency are common.<sup>27</sup> In these  
3 situations, during the cycle, the filaroid larvae (L3) of *S. stercoralis* migrates to the lungs  
4 and can further worsen the symptoms caused by the presence of *M. tuberculosis* in cases of  
5 coinfection.<sup>3,25</sup> Due to this fact, pulmonary symptoms (bronchospasm, cough, dyspnea, and  
6 expectoration of blood) may be caused by the parasites,<sup>28</sup> reinforcing the importance of  
7 adequate diagnosis.

8 The infections caused by helminths can also alter immunity, which favors the onset  
9 of diseases such as TB. The paradigm caused between the balance of pro-inflammatory and  
10 anti-inflammatory responses in tuberculosis when associated with human strongyloidiasis is  
11 an ever more relevant factor. A study conducted by George et al.<sup>4</sup> verified a reduction in the  
12 frequency of TCD4<sup>+</sup> cells, as well as in the levels of inflammatory cytokines Th1 (IFN- $\gamma$ ,  
13 TNF- $\alpha$ , and IL-2) and Th17 (IL-17), and an increase in IL-10 anti-inflammatory cytokines,  
14 especially in patients with tuberculosis coinfecting with *S. stercoralis*.

15 The data in our study, despite the low number of positive cases in the feces of the  
16 patients with TB (4%), are consistent with other authors, since the release of larvae can be  
17 compromised, especially due to the chronicity caused in these patients.<sup>25,29</sup> In light of this,  
18 immunological methods are investigated as a complementary strategy for improving the  
19 efficiency and high sensitivity and specificity of the diagnostics used in clinical practice.<sup>15,30</sup>

20 Using the immunoenzymatic method, ELISA, we observed that the detection of IgA  
21 both in saliva and in serum samples revealed more than 50% positivity and a significant  
22 difference between the groups ( $p < 0.05$ ), because IgA antibodies are present both in local and  
23 systemic responses,<sup>6</sup> making their presence, at an intestinal and pulmonary level,  
24 fundamental in the defense against tuberculosis and also against intestinal pathogens.

25 Saliva samples have been used in recent years as an alternative in diagnosing  
26 strongyloidiasis.<sup>9,15</sup> These samples offer advantages such as easy obtainment, non-invasive  
27 collection, and low cost,<sup>8,14,15</sup> they act as an important immunological barrier for the control  
28 of local and systemic pathogens, as well as presenting an abundance of immunoglobulins, a  
29 fact which is demonstrated in this study.

30 Our data show a similar pattern between the groups in relation to the detection of IgG  
31 in the saliva; however, one possible explanation is related with the negative modulation of

1 the humoral response in patients with tuberculosis. Anuradha et al.<sup>6</sup> experimentally  
2 demonstrated a reduction among the levels of IgM and IgG antibodies specific for *M.*  
3 *tuberculosis*, as well as in levels of BAFF (B-cell activating factor) cytokines and the  
4 proliferation-inducing ligand (APRIL), related in turn to the number of B memory cells and  
5 plasmatic cells. The resistance caused by the coinfection of these pathogens can cause the  
6 exacerbation of the associated inflammation, and in the absence of immunoregulatory  
7 controls induced by helminths, may potentially contribute to an increase in the seriousness  
8 of the disease.<sup>3,31</sup>

9 In our study, 58% of the samples were positive for IgG in the group with pulmonary  
10 tuberculosis. IgG antibodies are the biggest class of seric immunoglobulins capable of  
11 providing protective immunity and remain for a long time period after the disease is cured.<sup>29</sup>  
12 These characteristics are partly responsible for the success and advantages of diagnosing  
13 strongyloidiasis by detecting this class of immunoglobulins in serum and saliva samples  
14 from infected individuals.<sup>8,15,32</sup> It is also important to highlight that the catabolism of IgA is  
15 relatively quick in comparison with IgG, resulting in low concentrations of IgA in the  
16 control group.<sup>33</sup>

17 In this study, the EI of the IgG immune complexes circulating in the saliva and in the  
18 serum of the patients with TB showed interesting results when compared to the detection of  
19 IgA and isolated IgG, contributing to the understanding of the immune response profile of  
20 these patients when affected by strongyloidiasis. Immune complexes perform an important  
21 role in the neutralization of infectious agents, and are quickly eliminated from the blood  
22 flow through the innate immunological system. In addition, these immune complexes have  
23 been reported more frequently for parasitic diseases.<sup>9,34-37</sup> The few positive cases for IgG-IC,  
24 in the control group, may be explained by the persistence of IgG antibodies in an  
25 undiagnosed infection due to the low release of larvae in the feces and/or individuals with  
26 previous exposure residing in areas with a high prevalence of strongyloidiasis.<sup>9,29,38</sup>  
27 Immunological complexes participate in the physiopathology of the disease and, therefore,  
28 may reflect the immune response of each individual, enabling the control of this infection.<sup>36</sup>

29 The choice of an adequate immunological method for completing the parasitological  
30 diagnosis is essential for a precise estimate of cases of strongyloidiasis, especially in cases  
31 of coinfection with tuberculosis. Therefore, detecting the levels of circulating immune

1 complexes using an immunoenzymatic test may be very useful in cases of screening. Our  
2 data are pioneering and present promising results and an innovative proposal for the use of  
3 saliva samples, especially for IgG immune complex detection in patients with pulmonary  
4 tuberculosis.

5

#### 6 **ACKNOWLEDGEMENTS**

7 We thank all the patients and volunteers who participated in this study. We are grateful to  
8 the Reference Center for Tuberculosis Dr. Bruno Piancastelli Filho of the city of Londrina  
9 and to the Ambulatory of Specialties of the University Hospital of Londrina.

10

#### 11 **FINANCIAL SUPPORT**

12 This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
13 Superior (CAPES – Grant No. 40002012026M9 (L.R.B.)).

14

#### 15 **CONFLICT OF INTEREST**

16 The authors declare that there is no conflict of interest.

17

#### 18 **REFERENCES**

19

20 1. WHO - World Health Organization. Bending the curve: ending TB. Annual report 2017.  
21 WHO, 2017; 1-76.

22

23 2. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The immune  
24 response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2013; 31:475-527.

25

26 3. Salgame P, Yap GS, Gause WC. Effect of helminth-induced immunity on infections with  
27 microbial pathogens. *Nat Immunol* 2013; 14: 1118-1126.

28

29 4. George PJ, Anuradha R, Kumar NP, Sridhar R, Banurekha VV, Nutman TB, Babu S.  
30 Helminth infections coincident with active pulmonary tuberculosis inhibit. Mono- and  
31 multifunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses in a process dependent on IL-10. *PLoS*  
32 *Pathog* 2014; 10: e1004375.

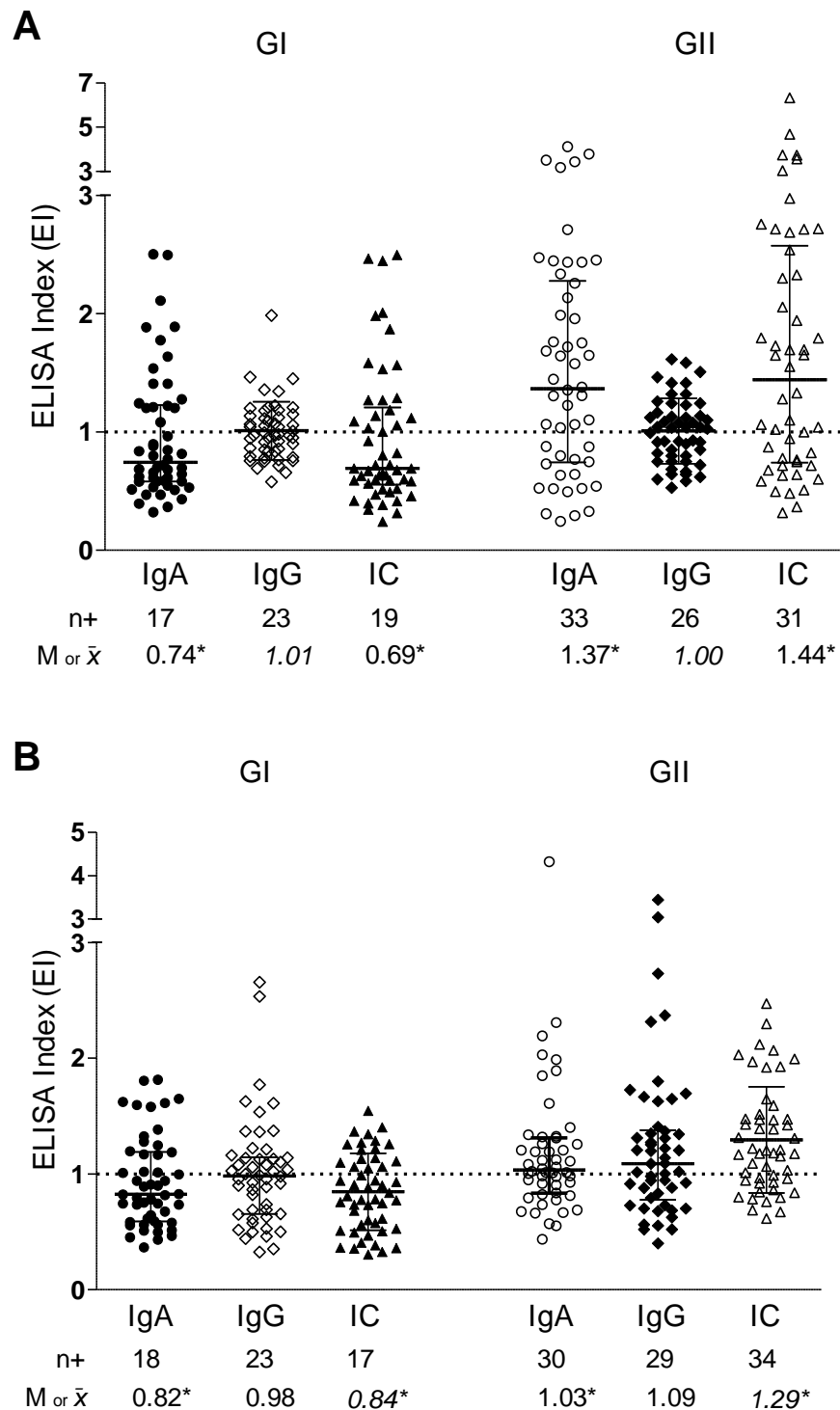
33

34 5. Bosqui LR, Silva SS, Sanfelice RA, Sampla MMM, Alvarenga DS, Lucas BB, Machado  
35 LF, Melanda FN, Custodio LA, Pavanelli WR, Conchon-Costa I, Costa IN. Clinical profile  
36 of patients diagnosed with tuberculosis treated at the University Hospital of Londrina,  
37 Paraná. *Semina: Ciênc Biol Saúde* 2017; 38: 89-98.

- 1 6. Anuradha R, Munisankar S, Bhootra Y, Dolla C, Kumaran P, Nutman TB, Babu S.  
2 Modulation of *Mycobacterium tuberculosis* - specific humoral immune responses is  
3 associated with *Strongyloides stercoralis* co-infection. PLoS Negl Trop Dis 2017; 11:  
4 e0005569.
- 5 7. Rafi W, Bhatt K, Gause WC, Salgame P. Neither primary nor memory immunity to  
6 *Mycobacterium tuberculosis* infection is compromised in mice with chronic enteric helminth  
7 infection. Infect Immun 2015; 83: 1217-1223.  
8
- 9 8. Ribeiro VS, Feliciano ND, Gonzaga HT, Costa IN, Gonçalves-Pires MR, Ueta MT,  
10 Costa-Cruz JM. Detergent fraction of heterologous antigen to detect IgA and IgG in  
11 strongyloidiasis using saliva and serum paired samples. Immunol Lett 2010; 134: 69-74.  
12
- 13 9. Bosqui LR, Gonçalves ALR, Gonçalves-Pires, MRF, Pavanelli WR, Conchon-Costa I,  
14 Costa-Cruz JM, Costa IN. Immune complex detection in saliva samples: a innovative  
15 proposal for the diagnosis of human strongyloidiasis. Parasitology 2018; 145:1090-1094.  
16
- 17 10. Kaufman E, Lamster, IB. The diagnostic applications of saliva - a review. Crit Rev Oral  
18 Biol Med 2002; 13:197-212.  
19
- 20 11. Loyola AM, Durighetto AFJr, Silva DA, Mineo JR. Anti-*Toxoplasma gondii*  
21 immunoglobulins A and G in human saliva and serum. J Oral Pathol Med 1997; 26: 187-  
22 191.  
23
- 24 12. Pinho RT, Pedrosa RC, Costa-Martins P, Castello-Branco LR. Saliva ELISA: a method  
25 for the diagnosis of chronic Chagas disease in endemic areas. Acta Trop 1999; 72: 31-38.  
26
- 27 13. Borges AS, Figueiredo JFC. Detection of anti-*Toxoplasma gondii* IgG, IgM and IgA  
28 immunoglobulins in the serum: cerebrospinal fluid and saliva of patients with acquired  
29 immunodeficiency syndrome and neurotoxoplasmosis. Arq Neuropsiquiatr 2004; 62: 1033-  
30 1037.  
31
- 32 14. Costa IN, Sopenete MC, Gonçalves-Pires MRF, Costa-Cruz JM. IgA and IgG antibodies  
33 in paired serum and saliva samples in human strongyloidiasis. Acta Parasitol 2003; 48: 306-  
34 311.  
35
- 36 15. Bosqui LR, Gonçalves AL, Gonçalves-Pires MR, Custodio LA, de Menezes MC, Murad  
37 VA, de Paula FM, Pavanelli WR, Conchon-Costa I, Costa-Cruz JM, Costa IN. Detection of  
38 parasite-specific IgG and IgA in paired serum and saliva samples for diagnosis of human  
39 strongyloidiasis in northern Paraná state, Brazil. Acta Trop 2015; 150: 190-195.  
40
- 41 16. Frank MM, Hester CG. Immune complexes: normal physiology and role in disease.  
42 New York: Allergy Frontiers: Classification and Pathomechanisms, 2009. 608p.  
43
- 44 17. De Carvalho C, Partata A, Hiramoto RM, Borborema SE, Meireles LR, Nascimento  
45 ND, de Andrade HF Jr. A simple immune complex dissociation ELISA for leishmaniasis:

- 1 standardization of the assay in experimental models and preliminary results in canine and  
2 human samples. *Acta Trop* 2013; 125:128-136.
- 3
- 4 18. Hoffmann WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation concentration method in  
5 *Schistosomiasis mansoni*. *J Public Health Trop Med* 1934; 9: 283-291.
- 6
- 7 19. Rugai E, Mattos T, Brisola AP. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes:  
8 modificações do método de Baermann. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1954; 14: 5-8.
- 9
- 10 20. Inês EJ, Souza JN, Santos RC, Souza ES, Santos FL, Silva ML, Silva MP, Teixeira MC,  
11 Soares NM. Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides*  
12 *stercoralis* and hookworm in faecal specimens. *Acta Trop* 2011; 120: 206-210.
- 13
- 14 21. Machado ER, Ueta, MT, Gonçalves-Pires MRF, Oliveira JBA, Faccioli H, Costa-Cruz  
15 JM. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis  
16 by enzyme-linked immune sorbent assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 849-851.
- 17
- 18 22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin  
19 phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 29: 265-275.
- 20
- 21 23. Gonçalves ALR, Silva CV, Ueta MT, Costa-Cruz JM. A new faecal antigen detection  
22 system for *Strongyloides venezuelensis* diagnosis in immunosuppressed rats. *Exp Parasitol*  
23 2010; 125: 338-341.
- 24
- 25 24. Greiner M, Sohr D, Göbel P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off  
26 values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J Immunol Methods*  
27 1995; 185: 123-132.
- 28
- 29 25. Cardoso BA, Fonseca FO, Moraes Neto AHA, Martins ACGS, Oliveira NVS, Costa-  
30 Lima LNGC, Dias GAS, Saad MHF. Environmental aspects related to tuberculosis and  
31 intestinal parasites in a low-income community of the Brazilian Amazon. *Rev Inst Med*  
32 *Trop São Paulo* 2017; 59: e57.
- 33
- 34 26. Paula FM, Costa-Cruz JM. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil.  
35 *Parasitology* 2011; 138: 1331-1340.
- 36
- 37 27. Pires ML, Dreyer G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. *Rev Hosp*  
38 *Clin Fac Med Univ São Paulo* 1993; 48: 175-182.
- 39
- 40 28. Tegegne Y, Wondmagegn T, Worku I, Jejaw Zeleke A. Prevalence of intestinal parasites  
41 and associated factors among pulmonary tuberculosis suspected patients attending  
42 University of Gondar Hospital, Gondar, Northwest Ethiopia. *J Parasitol Res* 2018; 2018:  
43 e9372145.
- 44

- 1 29. Iriemenam NC, Sanyaolu AO, Ooyibo WA, Fagbenro-Beyioku AF. *Strongyloides*  
2 *stercoralis* and the immune response. *Parasitol Int* 2010;59: 9-14.  
3
- 4 30. Buonfrate D, Gobbi F, Marchese V, Postiglione C, Badona Monteiro G, Giorli G,  
5 Napoletano G, Bisoffi Z. Extended screening for infectious diseases among newly arrived  
6 asylum seekers from Africa and Asia. *Euro Surveill* 2018; 23: 17-00527.  
7
- 8 31. Li XX, Ren ZP, Wang LX, Zhang H, Jiang SW, Chen JX, Wang JF, Zhou XN. Co-  
9 endemicity of pulmonary tuberculosis and intestinal helminth infection in the people's  
10 Republic of China. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10: e0004580.  
11
- 12 32. Agrawal V, Agarwal T, Ghoshal UC. Intestinal strongyloidiasis: a diagnosis frequently  
13 missed in the tropics. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103: 242-246.  
14
- 15 33. Benckert J, Schmolka N, Kreschel C, Zoller MJ, Sturm A, Wiedenmann B, Wardemann  
16 H. The majority of intestinal IgA<sup>+</sup> and IgG<sup>+</sup> plasmablasts in the human gut are antigen-  
17 specific. *J Clin Invest* 2011; 121: 1946-1955.  
18
- 19 34. Nezlin R. Circulating non-immune IgG complexes in health and disease. *Immunol Lett*  
20 2009; 122: 141-144.  
21
- 22 35. Madhusudana SN, Muhamuda K, Reeta M. Demonstration of immune complexes by  
23 capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Current Laboratory Techniques in Rabies*  
24 *Diagnosis, Research and Prevention*, 2014; 119.  
25
- 26 36. Gonçalves AL, de Araújo KC, Carvalho EF, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Specific IgG and  
27 immune complex responses to parthenogenetic females and eggs of nematode *Strongyloides*  
28 *venezuelensis* for the diagnosis of immunosuppression in infected rats. *J Helminthol* 2016;  
29 90: 342-346.  
30
- 31 37. Ohyama K, Huy NT, Yoshimi H, Kishikawa N, Nishizawa JE, Roca Y, Revollo Guzmán  
32 RJ, Velarde FU, Kuroda N, Hirayama K. Proteomic profile of circulating immune  
33 complexes in chronic Chagas disease. *Parasite Immunol* 2016; 38: 609-617.  
34
- 35 38. Ahmad AF, Hadip F, Ngui R, Lim YAL, Mahmud R. Serological and molecular  
36 detection of *Strongyloides stercoralis* infection among an Orang Asli community in  
37 Malaysia. *Parasitol Res* 2013; 112: 2811-2816.11  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44



1  
 2 **Fig. 1.** Detection of IgA, IgG and IgG immune complex (IC-IgG) anti-*Strongyloides stercoralis* in  
 3 saliva samples (A) and serum (B) determined by enzyme immunoassay using the alkaline extract L3  
 4 of *S. venezuelensis* expressed as ELISA index (EI). Negative control, apparently healthy individuals  
 5 (G I, n = 50) and patients under treatment for pulmonary tuberculosis (G II, n = 50). Dotted lines  
 6 represent the positivity threshold (EI > 1,0) and positioned in the median (M, interquartile range) or

1 mean ( $\bar{x}$ , with standard deviation, italic formatting). Significant differences (\*  $p < 0.05$ ) between the  
 2 groups after the t-test or Mann-Whitney.

3  
 4  
 5  
 6 **Table 1.** Sensitivity (Se), specificity (Es) and area under the ROC curve (AUC) in saliva and  
 7 serum samples in the detection of IgA, IgG and IC-IgGanti-*Strongyloides*.

	Saliva			Soro		
	AUC	Se (%)	Es (%)	AUC	Se (%)	Es (%)
IgA	0.68 (IC 0.57- 0.79)	66 (IC 51.23-78.79)		0.65 (IC 0.55- 0.76)	60 (IC 45.18-73.59)	64 (IC 49.19-77.08)
IgG	0.51 (IC 0.38- 0.62)	48 (IC 33.66-62.58)	46 (IC 31.81-60.68)	0.60 (IC 0.49- 0.71)	58 (IC 43.21-71.81)	54 (IC 39.32-68.19)
IC	0.71 (IC 0.61- 0.81)	62 (IC 47.18-75.35)		0.78 (IC 0.69- 0.87)	68 (IC 53.30-80.48)	66 (IC 51.23-78.79)

8 **IC – Int**

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

1 **4.6. ARTIGO 6**

2  
3  
4 **DNA ribossomal de *Strongyloides stercoralis* em pacientes com tuberculose**

5  
6 Larissa Rodrigues Bosqui, Géssica Baptista Melo, Fernanda de Mello Malta, Ivete  
7 Conchon-Costa, Wander Rogério Pavanelli, Ronaldo Cesar Borges Gryscek,  
8 Fabiana Martins de Paula, Idessania Nazareth Costa

9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19 **\*Será submetido para:** *Parasitology*

20  
21 QUALIS: A2

22  
23 F.I.: 2.51  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

1 **Ribosomal DNA of *Strongyloides stercoralis* in patients with pulmonary tuberculosis**

2  
3 Short title: “**DNA of *Strongyloides stercoralis* in tuberculosis**”

4  
5 Larissa Rodrigues Bosqui<sup>a</sup>, Géssica Baptista Melo<sup>b</sup>, Fernanda de Mello Malta<sup>b</sup>, Ivete  
6 Conchon-Costa<sup>a</sup>, Wander Rogério Pavanelli<sup>a</sup>, Ronaldo Cesar Borges Gryscek<sup>b</sup>, Fabiana  
7 Martins de Paula<sup>b</sup>, Idessania Nazareth Costa<sup>a\*</sup>

8  
9 <sup>a</sup>Universidade Estadual de Londrina, UEL. Rodovia Celso Garcia Cid Campus Universitário,  
10 Londrina, PR CEP 86051-990. Londrina, Brasil

11  
12 <sup>b</sup> Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, FMUSP. Av. Dr. Arnaldo, 455 -  
13 Cerqueira César, São Paulo, SP CEP 01246903. São Paulo, Brasil

14  
15 \*Corresponding author. Universidade Estadual de Londrina, UEL, Rodovia Celso Garcia  
16 Cid Campus Universitário, Londrina, PR. CEP 86051-990, Brazil. Phone: +55 433714539.  
17 Email address: [idedessania@hotmail.com](mailto:idedessania@hotmail.com)

18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

1 **ABSTRACT**

2  
3 Considering the increase in cases of tuberculosis in tropical and subtropical regions, areas  
4 with high prevalence of helminths, especially strongyloidiasis, and the particularly  
5 challenging detection of the larvae of *Strongyloides stercoralis*. The aim of this study was to  
6 detect *S. stercoralis* DNA in fresh fecal samples of patients with tuberculosis by using  
7 (PCR) real-time (qPCR) and conventional (cPCR) polymerase chain reaction. The fecal  
8 samples were obtained from 52 out-patients with diagnosis and treatment for pulmonary  
9 tuberculosis. We analyzed all fecal samples according to the methods of Hoffmann, Rugai as  
10 well as the agar plate culture method. The parasitology techniques showed a positivity of  
11 1.9% (1/52), while for qPCR and cPCR, the positivity was 30.7% (16/52). The Ct values  
12 varied from 32.6-40.9 (mean 38.2). Therefore, the use of molecular diagnosis can be  
13 regarded as a complementary tool in the screening of *S. stercoralis* infection, especially  
14 considering the severity of the coinfection in this group of patients.

15  
16 **Keywords:** strongyloidiasis, tuberculosis, molecular diagnosis, cPCR, qPCR.  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

## 1 INTRODUCTION

2  
3 Human strongyloides is an infection caused by *Strongyloides stercoralis* helminth  
4 and characterized as a neglected cosmopolitan, which affects about 370 million people  
5 worldwide (Bisoffi *et al.* 2013). It is strongly associated to alcoholism, transplants, HTLV-1  
6 virus, tuberculosis, and immunosuppression in general (Rodriguez *et al.* 2015; Silva *et al.*  
7 2015; Mendes *et al.* 2017).

8 The chronic phase is characterized with generally mild, nonspecific symptoms that  
9 affect the gastrointestinal tract (abdominal pain, diarrhea), respiratory system (similar to  
10 asthma or chronic obstructive pulmonary disease), and skin (pruritus, rash) (Greaves *et al.*  
11 2013). However, in immunocompromised individuals, such as those with tuberculosis,  
12 infection can become severe and potentially life-threatening due to a high load of parasites  
13 able (Buonfrate *et al.* 2015). In addition, *S. stercoralis* can modulate the immunological  
14 response, particularly in cases of coinfection, especially hampering the defense against  
15 *Mycobacterium tuberculosis* (George *et al.* 2014; Babu and Nutman, 2016; Anuradha *et al.*  
16 2017). Regardless of the few reports presented in the literature, the coinfection between *M.*  
17 *tuberculosis* and *S. stercoralis* reveals a worrying scenario for public health since both these  
18 illnesses are characterized with high occurrence and coincident vulnerable populations  
19 (George *et al.* 2014; Bosqui *et al.* 2017).

20 Screening for *S. stercoralis* infection is challenging, since the definitive diagnosis of  
21 *Strongyloides* is based on the detection of larvae in feces, which in most cases involves  
22 chronic infections with irregular production and little release of larvae (Repetto *et al.* 2016;  
23 Bosqui *et al.* 2018). It is important to highlight, even upon an early diagnosis, problems  
24 associated to the sensitivity of tests can generate false negative results suggesting the need  
25 for application of other diagnosis methodologies.

26 Techniques of DNA isolation in fresh fecal samples are viable, feasible, and  
27 applicable to diagnose parasitic infections in most of the endemic countries, especially due  
28 to the high sensitivity and specificity (Verweij and Stensvold, 2014; Lodh *et al.* 2016).  
29 Regarding the diagnosis of human strongyloidiasis, the fast detection of the parasite can  
30 benefit the correct, immediate treatment in immunocompromised patients (Verweij and  
31 Stensvold, 2014; Lodh *et al.* 2016), such as those with tuberculosis.

1 Subunits 18S and 28S of the ribosomal DNA *Strongyloides* have been used as  
2 amplification targets for both the real-time (qPCR) and conventional (cPCR) polymerase  
3 chain reaction (PCR) (Sultana *et al.* 2013; Verweij and Stensvold, 2014; Saugar *et al.* 2015;  
4 Dacal *et al.* 2018). Thus, the objective of this study was to assess the techniques of qPCR  
5 and cPCR for the diagnosis of *S. stercoralis* in patients with pulmonary tuberculosis.  
6

## 7 MATERIALS AND METHODS

### 9 2.1 Target population

10 This study was approved by the Research with Human Beings Ethics Committee of  
11 the State University of Londrina (protocol number: 1.306.715), state of Paraná, Brazil. The  
12 fecal samples were obtained from 52 out-patients (14 women and 38 men, between 11 and  
13 72 years old) attended at the Reference Center for Tuberculosis Dr. Bruno Piancastelli Filho  
14 in the city of Londrina – all diagnosed and undergoing treatment for pulmonary tuberculosis.  
15 All fecal samples were analyzed anonymously by two technical experts according to the  
16 methods of Hoffmann *et al.* (1934), Rugai *et al.* (1954) as well as the agar plate culture  
17 method (Inês *et al.* 2011).  
18

### 19 2.2 Molecular techniques

#### 20 2.2.1. DNA extraction

21 For extract the genetic material was used the commercial kit QIAamp DNA Stool  
22 Mini Kit (QIAGEN® Hilden, Germany), according to the manufacturer with some  
23 modifications, including the initial washing step with PBS and Polyvinyl solution (0.02g).  
24 The DNA extracted was eluted in 100µL and stored at -20°C until the moment of use.  
25

#### 26 2.2.2. Real-time and conventional PCR

27 Performed the qPCR (real-time PCR) according to the protocol described by Verweij  
28 *et al.* (2009). The reaction was carried out in a volume of 20 µL containing 5 µL of DNA,  
29 universal mixture of PCR TaqMan (Life Technologies Applied BioSystems, Foster City,  
30 CA, USA), 10 pmol / µL of each primer (18S ribosomal DNA *Strongyloides*) (front 5'-  
31 GAATTCCAAGTAAACGTAAGTCATT AGC-3' and reverse 5'-TGCCTCTGGATAT  
32 TGCTCAGTTC-3'), and 10 pmol / µL of the probes (FAM-5'-ACACACCGGCCGTCG

1 CTGC-3'-BHQ1), using the real-time PCR ABI 7300 system (Applied BioSystems, Life  
2 Technologies, Foster City, CA, USA). The conditions of magnification were established as  
3 50 cycles of 95°C for 15 min, 95°C for 15s, and 60°C for 1 min. Positive control (*S.*  
4 *stercoralis* larvae DNA) and negative control (PCR mixture without DNA) were included in  
5 each round of amplification. A sample was considered as negative when no amplification  
6 curve was observed (Basuni *et al.* 2011).

7 The cPCR (conventional PCR) was performed according to Kramme *et al.* (2011)  
8 using a fragment of approximately 180bp located in the region 28S ribosomal DNA  
9 *Strongyloides*. The amplification reaction mixture (20µL) consisted of PCR buffer (*GoTaq*®  
10 DNA Polymerase; Promega Corporation, Madison, USA), 0.2 mg of bovine serum albumin  
11 (Sigma Aldrich Corp.), 0.2 mM of dNTPs, 25mM of MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol of each primers,  
12 1U/µL of DNA Polymerase, 5µL of DNA, and double-distilled water. Cycling conditions  
13 were: 2 min at 94°C, 30 cycles of 1 min each at 94°C (denaturation), 1 min at 61.8°C  
14 (annealing), 1 min at 72°C (extension), and 2 min at 72°C (final extension) in a Master  
15 cycler ep gradient S thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The PCR products were  
16 loaded on a 2% agarose gel electrophoresis added with SYBR Safe (Invitrogen™, Thermo  
17 Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA USA). Included in each PCR run are positive  
18 control (*S. stercoralis* larvae DNA) and negative control (PCR mixture without DNA).

### 20 2.2.3. Sequencing

21 Sequencing reaction was based on the methodology of Sanger, Nicklen and Coulson  
22 (1977) according to the manufacturer's instructions of the kit BigDye® Terminator v3.1  
23 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific  
24 Corporation, Waltham, MA, USA) using an automatic sequencer ABI 3500 (Applied  
25 Biosystems). Sequences obtained were analysis using BioEdit software (Biological  
26 Sequence Alignment Editor) and aligned with *Strongyloides* sequences from GenBank using  
27 tool nBLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

## 29 3 RESULTS AND DISCUSSION

1 From the 52 fecal samples, only 1.9% (n=1) presented positive parasitology diagnosis  
2 for *S. stercoralis*. Despite the low positivity in the feces, our data are in accordance with  
3 other studies that demonstrate a compromised release of larvae (Schär *et al.* 2013; Cardoso  
4 *et al.* 2017).

5 The infection caused by *S. stercoralis* can manifest asymptotically or, in severe cases,  
6 through pulmonary edema and respiratory failure (Schär *et al.* 2013). Along the cycle, the  
7 filaroid larvae (L3) migrate to the lungs and can negatively influence a concomitant  
8 infection with *M. tuberculosis* (Salgame *et al.* 2013; Cardoso *et al.* 2017), which makes the  
9 patient's pathological picture even more severe. Therefore, the differential diagnosis of  
10 human *strongyloidiasis* has been increasingly more used in clinical applications aiming at  
11 enhancing the sensitivity of the methods as well as providing these patients with a fast  
12 treatment.

13 The optimization of *Strongyloides* diagnosis is certainly a crucial step to prevent  
14 complications and causalities resulting from this infection. Parasitology methods proved an  
15 unsatisfactory sensitivity, even upon the performance of agar plate culture. Although the  
16 serological tests revealed a good sensitivity, it continues to be problematic because of its  
17 cross-reactions (Bosqui *et al.* 2015; Chaves *et al.* 2015).

18 This study is first at assessing molecular methods to diagnose *Strongyloides* in  
19 patients with tuberculosis. In the qPCR, 30.7% (n=16) of the fecal samples had positive  
20 amplification for *S. stercoralis* with a mean value of Ct (threshold cycle) of 38.2 (32.6-40.9)  
21 (Table 1). According to Table 1, most of the samples presented high Ct, including the  
22 sample with positive parasitology: Ct = 40.9. Paula *et al.* (2016; 2018) and Stensvold and  
23 Nielsen (2012) point out that the qPCR can detect and quantify a relatively small number of  
24 products during amplification, even in the presence of low DNA concentration in the  
25 parasite.

26 In cPCR the target band was observed in 30.7% (16/52) of the DNA samples (Table  
27 1). Samples with positive amplification were submitted to sequencing, and the molecular  
28 diagnosis for *S. stercoralis* was confirmed. It is important to highlight that all samples that  
29 showed Ct value in qPCR also presented the target fragment through in cPCR.

30 Molecular techniques have been increasingly more applied to improve the diagnosis  
31 of strongyloidiasis (Verweij *et al.* 2009; Kramme *et al.* 2011; Repetto *et al.* 2016) for

1 presenting high sensitivity in relation to parasitology methods. However, due to its high  
2 cost, they are still not applicable in routine laboratory.

3 Different reports on the sensitivity of the methods indicate mainly the molecular  
4 techniques have better or similar results achieved by Baermann or agar culture (Verweij *et al.*  
5 *et al.* 2009; Moghaddassani *et al.* 2011; Saugar *et al.* 2015; Dacal *et al.* 2018). In contrast, Sitta  
6 *et al.* (2014) demonstrated that the cPCR can be applied combined with parasitology  
7 methods for the *Strongyloides* molecular diagnosis.

8 Platforms of qPCR have been regarded as more advantageous in relation to the cPCR  
9 tests because of their high sensitivity, lower contamination risk and shorter time (Paula *et al.*  
10 2018). Different regions of ribosomal DNA, especially in the subunits 18S and 28S, have  
11 been considered targets for molecular assessments to diagnose *Strongyloides* sp. (Dorris *et al.*  
12 *et al.* 2002; Verweij *et al.* 2009; Kramme *et al.* 2011; Sitta *et al.* 2014; Repetto *et al.* 2016).

13 In conclusion, the molecular assay demonstrates better detection of *S. stercoralis*  
14 infection. Thus, we can suggest the use of molecular diagnosis as a complementary tool in  
15 the screening of strongyloidiasis, especially considering the possibility of this helminthiasis  
16 severity in co-infection (*S. stercoralis* and *M. tuberculosis*).

## 18 **ACKNOWLEDGEMENT**

19 We acknowledge the patients and volunteers who agreed to participate in this study.

## 21 **FINANCIAL SUPPORT**

22 This study was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal  
23 de Nível Superior (CAPES – Grant No. 40002012026M9 (L.R.B.) and Fundação de Amparo  
24 à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP—Grant no. 2013/03304-0).

## 26 **CONFLICTS OF INTEREST**

27 None

## 29 **REFERENCES**

31 **Anuradha, R, Munisankar, S, Bhootra, Y, Dolla, C, Kumaran, P, Nutman, TB and**  
32 **Babu, S** (2017) Modulation of Mycobacterium tuberculosis-specific humoral immune

- 1 responses is associated with *Strongyloides stercoralis* co-infection. *PLOS Neglected*  
2 *Tropical Diseases* **11**, 55-69. doi: 10.1371/journal.pntd.0005569.
- 3 **Babu, S and Nutman, TB** (2016) Helminth-Tuberculosis Co-infection: An Immunologic  
4 Perspective. *Trends in Immunology* **37**, 597-607. doi: 10.1016/j.it.2016.07.005.
- 5 **Basuni, M, Muhi, J, Othman, N, Verweij, J, Ahmad, M, Miswan, N, Rahumatullah, A,**  
6 **Aziz, FA, Zainudin, NS and Noordin, R** (2011) A pentaplex Real-time Polymerase Chain  
7 Reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. *The American*  
8 *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **84**, 338-343. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0499.
- 9 **Bisoffi, Z, Buonfrate, D, Montresor, A, Requena-Méndez, A, Munõs, J, Krolewiecki,**  
10 **AJ, Gotuzzo, E, Mena, MA, Chiodini, PL, Anselmi, M, Moreira, J and Albonico, M**  
11 (2013) *Strongyloides stercoralis*: A Plea for Action. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **7**,  
12 e2214. doi: 10.1371/journal.pntd.0002214.
- 13 **Bosqui, LR, Silva, SS, Sanfelice, RA, Miranda- Sampla, MM, Alvarenga, DS, Lucas,**  
14 **BB, Machado, LF, Melanda, FN, Custodio, LA, Pavanelli, WR, Conchon-Costa, I and**  
15 **Costa, IN** (2017). Clinical profile of patients diagnosed with tuberculosis treated at the  
16 University Hospital of Londrina, Paraná. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde* **38**, 89-98.  
17 doi: 10.5433/1679-0367.2017v38n1p89.
- 18 **Bosqui, LR, Gonçalves, AL, Gonçalves-Pires, MR, Custodio, LA, Menezes, MCND,**  
19 **Murad, VA, Paula, FM, Pavanelli, WR, Conchon-Costa, I, Costa-Cruz, JM, Costa, IN**  
20 (2015) Detection of parasite-specific IgG and IgA in paired serum and saliva samples for  
21 diagnosis of human strongyloidiasis in northern Paraná state, Brazil. *Acta Tropica* **150**, 190-  
22 195. [https://doi: 10.1016/j.actatropica.2015.07.026](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.026).

- 1 **Bosqui, LR, Marques, PD, Melo, GB, Gonçalves-Pires, MRF, Malta, FM, Pavanelli,**  
2 **WR, Conchon-Costa, I, Costa-Cruz, JM, Paula, FM and Costa, IN** (2018) Molecular  
3 and Immune Diagnosis: Further Testing for Human Strongyloidiasis. *Molecular Diagnosis*  
4 *& Therapy* **22**, 485-491.
- 5 **Buonfrate, D, Sequi, M, Mejia, R, Cimino, RO, Krolewiecki, AJ, Albonico, M, Degani,**  
6 **M, Tais, S, Angheben, A, Requena-Mendez, A, Muñoz, J, Nutman, TB and Bisoffi, Z**  
7 (2015) Accuracy of Five Serologic Tests for the Follow up of *Strongyloides stercoralis*  
8 Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **9**, e0003491. doi:  
9 10.1371/journal.pntd.0003491.
- 10 **Cardoso, BA, Fonseca, FO, Moraes-Neto, AHA, Martins, ACGS, Oliveira, NVS, Lima,**  
11 **LNG and Saad, MHF** (2017) Environmental aspects related to tuberculosis and intestinal  
12 parasites in a low-income community of the Brazilian Amazon. *Revista do Instituto de*  
13 *Medicina Tropical de São Paulo* **59**, e57.
- 14 **Chaves, LA, Gonçalves, ALR, Paula, FM and Silva, NM** (2015) Comparison of  
15 parasitological, immunological and molecular methods for evaluation of fecal samples of  
16 immunosuppressed rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*.  
17 *Parasitology* **142**, 1715-1721. doi: 10.1017/S0031182015001298.
- 18
- 19 **Dacal, E, Saugar, JM, Soler, T, Azcárate, JM, Jiménez, MS, Merino, FJ and**  
20 **Rodríguez, E** (2018) Parasitological versus molecular diagnosis of strongyloidiasis in serial  
21 stool samples: how many? *Journal of Helminthology* **92**,12-16.

- 1 **Dorris, M, Viney, ME and Blaxter, LM** (2002) Molecular phylogenetic analysis of the  
2 genus *Strongyloides* and related nematodes. *International Journal for Parasitology* **32**,  
3 1507-1517. doi: 10.1016/S0020-7519(02)00156-X.
- 4 **George, PJ, Anuradha, R, Kumar, NP, Sridhar, R, Banurekha, VV, Nutman, TB and**  
5 **Babu, S** (2014) Helminth Infections Coincidente with Active Pulmonary Tuberculosis  
6 Inhibit Mono- and Multifunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cell Responses in a Process  
7 Dependent on IL-10. *PLOS Pathogens* **10**, e1004375. doi: 10.1371/ journal.ppat.1004375.
- 8 **Greaves, D, Cogle, S, Pollard, C, Aliyu, SH and Moore, EM** (2013) *Strongyloides*  
9 *stercoralis* infection. *BMJ* **347**, f4610. doi: 10.1136/bmj.f4610.
- 10 **Hoffmann, WA, Pons, JA and Janer, JL** (1934) The sedimentation concentration method  
11 in schistosomiasis *mansoni*, Puerto Rico. *Journal of Public Health and Tropical Medicine* **9**,  
12 283-291.
- 13 **Inês, EJ, Souza, JN, Santos, RC, Souza, ES, Santos, FL, Silva, MLS, Silva, MP,**  
14 **Teixeira, MCA and Soares, NM** (2011) Efficacy of parasitological methods for the  
15 diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. *Acta Tropica*  
16 **120**, 206-210. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.08.010.
- 17 **Kramme, S, Nissen, N, Soblik, H, Erttmann, K, Tannich, E, Fleischer, B, Panning, M**  
18 **and Brattig, N** (2011) Novel real-time PCR for the universal detection of *Strongyloides*  
19 species. *Journal of Medical Microbiology* **60**, 454-458.  
20 <https://doi.org/10.1099/jmm.0.025338-0>.

- 1 **Lodh, N, Caro, N, Sofer, S, Scott, A, Krolewiecki, A and Shiff, C** (2016) Diagnosis of  
2 *Strongyloides stercoralis*: Detection of parasite - derived DNA in urine. *Acta Tropica* **163**,  
3 9-13. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.07.014>.
- 4 **Mendes, T, Minori, K, Ueta, M, Miguel, DC and Allegretti, SM** (2017) Strongyloidiasis  
5 current status with emphasis in diagnosis and drug research. *Journal of Parasitology*  
6 *Research* **2017**, 5056314. <https://doi.org/10.1155/2017/5056314>.
- 7 **Moghaddassani, H, Mirhendi, H, Hosseini, M, Rokni, MB, Mowlavi, G and Kia, E**  
8 (2011) Molecular Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* Infection by PCR Detection of  
9 Specific DNA in Human Stool Samples. *Iranian Journal of Parasitology* **6**, 23-30.
- 10 **Paula, FM, Malta, FM, Corral, MA, Marques, PD, Gottardi, M, Meisel, DMCL,**  
11 **Yamashiro, J, Pinho, JR, Castilho, VL, Gonçalves, EMN, Gryscek RCB and Chieffi**  
12 **PP** (2016) Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection in immunocompromised patients  
13 by serological and molecular methods. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São*  
14 *Paulo* **1**, 58- 63. <http://doi: 10.1590/S1678-9946201658063>.
- 15 **Paula, FM, Malta, FM, Marques, PD, Melo, GB, Gottardi, M, Pinho, JRR, Gonçalves,**  
16 **EMN, Castilho, VLP, Pierrotti, LC, Abdala, E, Costa, SP, Chieffi, PP and Gryscek,**  
17 **RCB** (2018) Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* among transplant candidates.  
18 *Transplant Infectious Disease* **20**, e12909.
- 19 **Repetto, SA, Ruybal, P, Solana, ME, López, C, Berini, CA, Alba Soto, CD and Cappa,**  
20 **SM** (2016) Comparison between PCR and larvae visualization methods for diagnosis of

- 1 *Strongyloides stercoralis* out of endemic area: a proposed algorithm. *Acta Tropica* **157**, 169-  
2 77. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.02.004>.
- 3 **Rodriguez, EA, Abraham, T, and Williams, FK** (2015) Severe strongyloidiasis with  
4 negative serology after corticosteroid treatment. *Journal of Medical Case Reports* **16**, 95-98.  
5 [http://doi: 10.12659/AJCR.892759](http://doi:10.12659/AJCR.892759).
- 6 **Rugai, E, Mattos, T and Brisola, AP** (1954) Nova técnica para isolar larvas de nematóides  
7 das fezes: modificações do método de Baermann. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* **14**, 5-8.
- 8 **Salgame, P, Yap, GS and Gause, WC** (2013) Effect of helminth-induced immunity on  
9 infections with microbial pathogens. *Nature Immunology* **14**, 1118-1126. [https://doi:](https://doi:10.1038/ni.2736)  
10 [10.1038/ni.2736](https://doi:10.1038/ni.2736).
- 11 **Sanger, F, Nicklen, S and Coulson, AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating  
12 inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*  
13 **74**, 5463-5467.
- 14 **Saugar, JM, Merino, FJP, Martín-Rabadán, P, Fernández-Soto, P, Ortega, S; Gárate,**  
15 **T and Rodríguez, E** (2015) Application of real-time PCR for the detection of *Strongyloides*  
16 spp. In clinical samples in a reference center in Spain. *Acta Tropica* **142**, 20-25.  
17 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.10.020>.
- 18 **Schär, F, Trostorf, U, Giardina, F, Khieu, V, Muth, S, Marti, H, Vounatsou, P and**  
19 **Odermat, P** (2013) *Strongyloides stercoralis*: global distribution and risk factors. *PLOS*  
20 *Neglected Tropical Diseases* **7**, 1-17.

- 1 **Silva, MLS, Inês, EJ, Souza, ABS, Dias, VMS, Guimarães, CM, Edimarcia, R,**  
2 **Barbosa, LC, Alves, MDCM, Teixeira, MCA and Soares, NM** (2015) Association  
3 between *Strongyloides stercoralis* infection and cortisol secretion in alcoholic patients. *Acta*  
4 *Tropica* **154**, 133-138. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.11.010>.
- 5 **Sitta, RB, Malta, FM, Pinho, JR, Chieffi, PP and Gryscek, RC** (2014) Conventional  
6 PCR for molecular diagnosis of human strongyloidiasis. *Parasitology* **141**,716-721.  
7 <https://doi.org.10.1017/S0031182013002035>.
- 8 **Stensvold, CR and Nielsen, HV** (2012) Comparison of microscopy and PCR for detection  
9 of intestinal parasites in Danish patients supports an incentive for molecular screening  
10 platforms. *Journal of Clinical Microbiology* **50**, 540-541.  
11 <https://doi.org.10.1128/JCM.06012-11>.
- 12 **Sultana, Y, Jeffreys, N, Watts, MR, Gilbert, GL and Lee, R** (2013) Real-time  
13 polymerase chain reaction for detection of *Strongyloides stercoralis* in stool. *The American*  
14 *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **88**, 1048-1051.<https://10.4269/ajtmh.12-0437>.
- 15 **Verweij, JJ, Canales, M, Polman, K, Ziem, J, Brienen, EAT, Polderman, AM and**  
16 **Lieshout, LV** (2009) Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples  
17 using real-time PCR. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*  
18 **103**, 342-346. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.12.001>.
- 19 **Verweij, JJ and Stensvold, CR** (2014) Molecular testing for clinical diagnosis and  
20 epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clinical Microbiology*  
21 *Reviews* **27**, 371-418. <https://doi:10.1128/CMR.00122-13>.

1 **Table 1.** Molecular diagnosis of strongyloidiasis in faecal samples from patients with  
 2 tuberculosis.

<b><u>Molecular diagnostic</u></b>		
<b>ID samples</b>	<b>qPCR (18S)</b> Ct value	<b>cPCR (28S)</b>
<b>1Tb</b>	32.6	+
<b>2Tb</b>	35.2	+
<b>12Tb</b>	38.1	+
<b>15Tb</b>	37.9	+
<b>18Tb</b>	40.4	+
<b>19Tb</b>	38.2	+
<b>20Tb</b>	40.9	+
<b>21Tb</b>	38.3	+
<b>22Tb</b>	40.3	+
<b>30Tb</b>	37.5	+
<b>35Tb</b>	36.9	+
<b>44Tb</b>	39.4	+
<b>45Tb</b>	37.7	+
<b>47Tb</b>	37.1	+
<b>49Tb</b>	39.1	+
<b>50Tb</b>	38.4	+

3 ID samples = identification number of samples; qPCR= real-time PCR; cPCR= conventional PCR.

4  
 5  
 6  
 7  
 8  
 9  
 10  
 11  
 12  
 13  
 14  
 15  
 16  
 17  
 18  
 19  
 20  
 21  
 22  
 23

## 1 **CONCLUSÃO GERAL**

2  
3       Esse é um estudo pioneiro, que apresenta resultados promissores e uma  
4 proposta inovadora na utilização de amostras de saliva, em especial, para a  
5 detecção de imunocomplexo-IgG, o qual possibilita a aplicação de um teste  
6 comercial para detecção tanto de IC-IgG quanto de IgA anti-*S. stercoralis* em  
7 amostras de saliva pelo método Dot-ELISA.

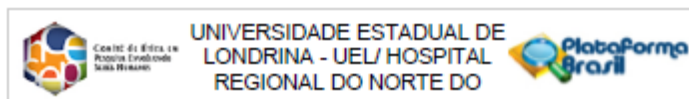
8       O ensaio molecular apresentado neste estudo oferece melhor detecção e  
9 identificação dessa helmintíase, evidenciando que o uso do diagnóstico molecular  
10 associado ao imunodiagnóstico, pode ser considerado uma ferramenta  
11 complementar na triagem da estrogiloidíase, especialmente, considerando a  
12 gravidade da coinfeção neste grupo de pacientes com tuberculose. Além disso, o  
13 rastreamento de DNA nas fezes de indivíduos com sorologia positiva foi eficiente  
14 em excluir casos de infecções antigas.

15       Por fim, combinação de diferentes métodos pode auxiliar ensaios clínicos e  
16 cenários que exigem um diagnóstico rápido e preciso, como no caso  
17 estrogiloidíase.

18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

1 **5. ANEXOS**

2

3 **5.1. Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres**  
4 **Humanos da Universidade Estadual de Londrina**

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Diagnóstico coparasitológico, imunológico e molecular da estrogiloidiase em pacientes portadores de Tuberculose

**Pesquisador:** Idessania Nazareth da Costa

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 47661215.8.0000.5231

**Instituição Proponente:** Programa de PG em Patologia Experimental

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.306.715

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se uma pesquisa de doutoramento vinculado ao programa de pós-graduação em Patologia Experimental da aluna Larissa Rodrigues Bosqui Sob orientação da Profa. Idessania Nazareth da Costa. A estrogiloidiase é uma parasitose de prevalência mundial e está entre as seis primeiras dentre as infecções causadas por geohelminths. Os indivíduos infectados são assintomáticos na maioria dos casos, enquanto que os outros podem apresentar desconfortos gastrointestinais. Porém, em pacientes imunocomprometidos as manifestações promovem quadros graves potencialmente fatais. Nestes casos, o diagnóstico precoce e tratamento adequado são essenciais. O diagnóstico parasitológico da estrogiloidiase apresenta dificuldades uma vez que a liberação de larvas nas fezes é pequena e irregular, além de necessitar de análise por método e equipe especializada. Assim, o objetivo desse projeto é realizar o diagnóstico coparasitológico, imunológico e molecular de indivíduos provenientes do Centro de Referência Dr. Bruno Piancastelli Filho da cidade de Londrina- PR com tuberculose e infectados por *Strongyloides stercoralis*, e estabelecer a sensibilidade e especificidade entre os testes associando os aspectos clínicos apresentados por estes pacientes e investigar a relação de estrogiloidiase em pacientes portadores de tuberculose e a partir disso avaliar parâmetros de diagnóstico bem como aspectos clínicos apresentados pelos pacientes na região de Londrina.

Endereço: LABESC - Sala 14	CEP: 86.057-970
Bairro: Campus Universitário	
UF: PR	Município: LONDRINA
Telefone: (43)3371-5465	E-mail: cep26@uel.br

5

6

7

8

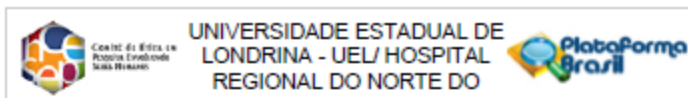
9

10

11

12

13



Continuação do Projeto: 1.306.715

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:** Investigar o perfil de diagnóstico coproparasitológico, imunológico e molecular de indivíduos com tuberculose e infectados por *Strongyloides stercoralis*.

**Objetivo Secundário:** - Coleta de amostras de sangue, saliva e fezes de pacientes atendidos no Centro de Referência Dr. Bruno Piancastelli Filho da cidade de Londrina. - Realização dos testes parasitológicos por meio dos métodos de Rujal e Lutz para pesquisa de ovos e larvas de helmintos ou cistos de protozoários, bem como Cultura em Placa de Agar para pesquisa de larvas de *S. stercoralis*. - Separar as amostras de indivíduos TB positivos e monoparasitados dos positivos para *S. stercoralis*. - Realização de teste imunológico (ELISA), para pesquisa de anticorpos IgA e IgG em amostras pareadas de saliva e soro destes pacientes. - Realização do diagnóstico molecular, através da PCR utilizando amostras fecais dos pacientes TB e positivos para *S. stercoralis*. - Estabelecer a relação entre TB e a infecção por *S. stercoralis*, bem como a sensibilidade e especificidade entre os testes parasitológicos, imunológico e molecular, associados aos aspectos clínicos apresentados por estes pacientes

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

A pesquisadora afirma que "não haverá qualquer risco físico ou mental aos participantes e dos manipuladores. Caso haja alguma intercorrência, os mesmos deverão encaminhar-se ao Laboratório de Parasitologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina"

**Benefícios:**

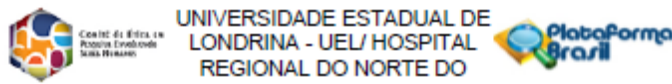
O trabalho contribuirá com a comunidade científica e a população no sentido de minimizar diagnósticos falso negativos da estrogiloidíase (infecção grave em indivíduos imunocomprometidos, incluindo pacientes com tuberculose) permitindo o tratamento precoce. Os pesquisadores acreditam que a utilização da saliva poderá ser utilizada na rotina clínica como amostra alternativa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

1 - A coleta de amostras de sangue, saliva e fezes serão realizados nos pacientes atendidos no Centro de Referência Dr. Bruno Piancastelli Filho da cidade de Londrina por profissional treinado e não haverá armazenamento das amostras em banco.

Endereço: LABESC - Sala 14	CEP: 86.027-070
Bairro: Campus Universitário	
UF: PR	Município: LONDRINA
Telefone: (43)3371-5455	E-mail: cep260@uel.br

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12



Continuação do Parecer: 1.306.715

2 - serão avaliados pacientes com tuberculose, acima de 18 anos e negativos para HIV.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A pesquisadora apresentou o TCLE, autorização da Autarquia Municipal de Londrina e a folha de rosto e termo de sigilo e confidencialidade devidamente assinados.

**Recomendações:**

não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

a pesquisadora corrigiu todas as pendências, sendo considerado o projeto aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Prezado (a) Pesquisador (a),

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade imprimi-lo para apresentação aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Coordenação CEP/UEL

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_554292.pdf	19/10/2015 12:14:35		Aceito
Outros	termo_confidencialidade_e_sigilo.pdf	19/10/2015 12:14:08	Idessania Nazareth da Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_livre_esclarecido_corrigido.docx	19/10/2015 12:10:52	Idessania Nazareth da Costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_08_10.doc	08/10/2015 10:03:22	Idessania Nazareth da Costa	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_atual.pdf	08/09/2015 11:49:54	Idessania Nazareth da Costa	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Aprovação da CONEP:**

Não

Endereço: LABESC - Sala 14  
Bairro: Campus Universitário  
UF: PR Município: LONDRINA CEP: 86.057-070  
Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep200@uel.br

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12

- 1 5.2. Aquiescência da Direção da Unidade Básica de Saúde de Londrina,
- 2 Ibiporã e Cambé para realização do estudo

**PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE LONDRINA**

AUTARQUIA MUNICIPAL DE SAÚDE  
ESTADO DO PARANÁ

**A U T O R I Z A Ç Ã O P R O V I S Ó R I A D E P E S Q U I S A**

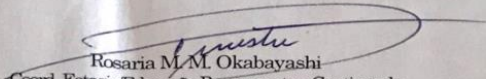
**Pendência- parecer do CEP**

**C.P. 14/2015/CEEPC/GPQS/AMS/PML**

Informamos para fins de realização da pesquisa:

“DIAGNÓSTICO COPROPARASITOLÓGICO, IMUNÓGICO E MOLECULAR DA ESTRONGILOIDÍASE EM PACIENTES PORTADORES DE TUBERCULOSE” NA Autarquia Municipal de Saúde da Prefeitura de Londrina pela aluna Larissa Rodrigues Bosqui do Programa de Pós graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina – pré requisito parcial para o título de Doutorado em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, sob orientação da Professora Dra. Ivete Conchon Costa da mesma Universidade; e que por tratar-se de pesquisa com seres humanos, deverá seguir as orientações da CNS Nº. 466/12. Desta forma, sua execução nesta Autarquia será autorizada somente após a apresentação do parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, credenciado pelo CONEP, e planejamento prévio com a unidade de serviço envolvida.

Londrina, 25 de maio de 2015.

  
Rosaria M.M. Okabayashi  
Coord. Estágio/Educação Permanente e Continuada  
GPQS/DGTES/AMS/PML

- 3
- 4
- 5
- 6



**Prefeitura Municipal de Cambé**

ESTADO DO PARANÁ  
Secretaria Municipal de Saúde Pública

AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA

Informamos para fins de realização da pesquisa: **"DIAGNÓSTICO COPROPARASITOLÓGICO, IMUNOLÓGICO E MOLECULAR DA ESTRONGILOIDÍASE EM PACIENTES PORTADORES DE TUBERCULOSE"** na Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Cambé, pela aluna de doutorado do curso de Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, Larissa Bosqui, orientada pela Professora Idessania Nazareth da Costa, docente em Parasitologia da mesma Universidade e que por tratar-se de pesquisa com seres humanos, deverá seguir as orientações da resolução CNS N° 466/12. Desta forma, sua execução nesta autarquia está autorizada considerando o parecer favorável do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos.

\_\_\_\_\_  
Maria de Brito Lo Sarzi

Secretária Municipal de Saúde

Prefeitura Municipal de Cambé

Rua Pará, 154 - Centro - cep: 86181-240 - Cambé/PR - Fone/Fax: 3174-0226  
E-mail: [epidemio@cambe.pr.gov.br](mailto:epidemio@cambe.pr.gov.br) Site: <http://www.cambe.pr.gov.br>



**PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE IBIPORÃ  
ESTADO DO PARANÁ**

**SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE**

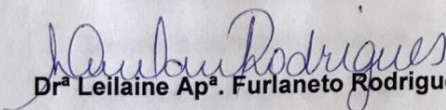
**AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA**

Ibiporã, 13 de setembro de 2016.

**AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA**

Informamos para fins de realização da pesquisa:  
"ESTUDO DIAGNOSTICO COPROPARASITOLÓGICO IMUNOLOGICO E MOLECULAR DA ESTRONGILOIDÍASE EM PACIENTES PORTADORES DE TUBERCULOSE" na Secretaria Municipal de Saúde de Ibiporã pela aluna do curso de Mestrado em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, Larissa Rodrigues Bosqui, orientada pela Professora Idessania Nazareth da Costa, docente em Parasitologia da mesma Universidade e que por tratar-se de pesquisa com seres humanos, deverá seguir as orientações da Res. CNS N°. 466/12. Desta forma, sua execução nesta Secretaria está autorizada considerando o parecer favorável do Comitê de ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos nº 1.306.715.

Atenciosamente,

  
**Dr<sup>a</sup> Leilaine Ap<sup>a</sup>. Furlaneto Rodrigues**  
Secretária Municipal de Saúde

1 **5.3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

2  
3 **“DIAGNÓSTICO COPROPARASITOLÓGICO, IMUNOLÓGICO E MOLECULAR**  
4 **DA ESTRONGILOIDÍASE EM PACIENTES PORTADORES DE TUBERCULOSE”.**

5  
6 Prezado(a) Senhor(a):

7  
8 Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa **“DIAGNÓSTICO**  
9 **COPROPARASITOLÓGICO, IMUNOLÓGICO E MOLECULAR DA**  
10 **ESTRONGILOIDÍASE EM PACIENTES PORTADORES DE TUBERCULOSE”**,  
11 realizada no “Laboratório de Parasitologia da Universidade Estadual de Londrina-  
12 PR”. O objetivo da pesquisa é identificar a presença ou não de parasitos em  
13 amostras de fezes e de anticorpos em amostras de soro e saliva em pacientes com  
14 strongiloidíase portadores ou não de tuberculose.

15 Sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma:  
16 doação de amostras de fezes, saliva e sangue, que serão coletadas no Centro de  
17 Referência Dr. Bruno Piancastelli Filho da cidade de Londrina-PR.

18 Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo o (a)  
19 senhor (a): recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem  
20 que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos, também,  
21 que suas informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão  
22 tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua  
23 identidade.

24 Para a coleta das amostras de fezes serão entregues potes coletores sem  
25 conservantes no dia agendado. As amostras de fezes serão entregues no Centro  
26 de Referência Dr. Bruno Piancastelli Filho da cidade de Londrina-PR, onde neste  
27 mesmo local serão coletadas amostras de sangue através de punção venosa por  
28 profissional especializado e posteriormente, por este mesmo profissional, será  
29 entregue algodão limpo para a coleta da saliva.

30 Esclarecemos ainda, que o(a) senhor(a) não pagará e nem será  
31 remunerado(a) por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as

1 despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e  
2 decorrentes especificamente de sua participação.

3 Os benefícios esperados são o controle de parasitoses de maneira geral  
4 ajudando no diagnóstico correto e rápido dessas parasitoses e associação destas  
5 com a tuberculose. Além disso, se for observado parasitas, o sr(a) encaminhado  
6 para tratamento.

7 Quanto aos riscos, não haverá qualquer risco à saúde física ou mental do  
8 participante. Caso haja alguma intercorrência, o sr(a) será encaminhado(a) ao  
9 laboratório de parasitologia experimental da Universidade Estadual de Londrina.

10 Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos  
11 contatar: Ms. Larissa Rodrigues Bosqui, telefone (43)9976-2833, email  
12 [larissabosqui@hotmail.com](mailto:larissabosqui@hotmail.com) (Biomédica responsável pela coleta das amostras), ou  
13 procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da  
14 Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola,  
15 no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: [cep268@uel.br](mailto:cep268@uel.br).

16 Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma  
17 delas devidamente preenchida, assinada e entregue ao (à) senhor(a).

18

19 Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201 .

20

21 **Pesquisador Responsável:** Prof. Dra. Idessania Nazareth Costa

22 RG: M7 711 160

23

24

25 \_\_\_\_\_ (nome por extenso do sujeito de  
26 pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da  
27 pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

28

29 Assinatura (ou impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_

30

Data: \_\_\_\_\_

31