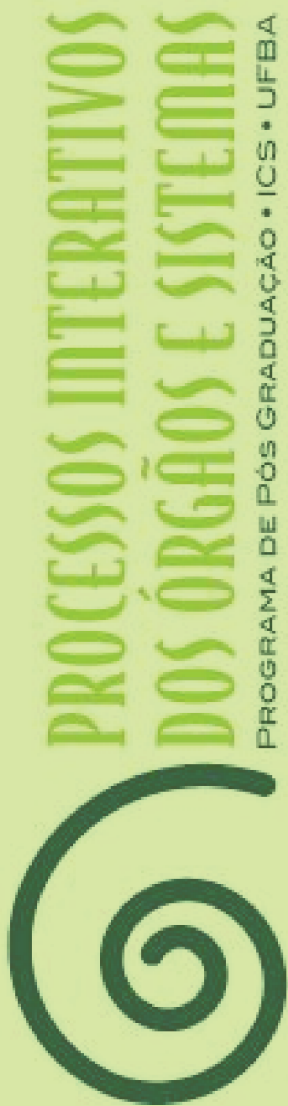


JOELMA NASCIMENTO DE SOUZA



**IMUNODIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO
POR *Strongyloides stercoralis* EM
PACIENTES ALCOOLISTAS**

**Salvador
2018**



**PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS
INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**

JOELMA NASCIMENTO DE SOUZA

**IMUNODIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR
Strongyloides stercoralis EM PACIENTES ALCOOLISTAS**

**Salvador
2018**

JOELMA NASCIMENTO DE SOUZA

**IMUNODIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR
Strongyloides stercoralis EM PACIENTES ALCOOLISTAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas (PIOS), Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Doutor.

Orientadora: Prof Dr Neci Matos Soares.

Co-orientadora: Prof Dr Márcia Cristina Aquino Teixeira

**Salvador
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

de Souza, Joelma Nascimento
Imunodiagnóstico da Infecção por *Strongyloides*
stercoralis em pacientes alcoolistas / Joelma
Nascimento de Souza. -- Salvador, 2018.
121 f.

Orientador: Neci matos Soares.
Coorientador: Márcia Cristina Aquino Teixeira.
Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) --
Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências
da Saúde, 2018.

1. *Strongyloides stercoralis*. 2. Imunodiagnóstico.
3. Imunorreatividade. 4. Alcoolistas. I. Soares, Neci
matos. II. Teixeira, Márcia Cristina Aquino . III.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



TERMO DE APROVAÇÃO

DEFESA PÚBLICA DA TESE

JOELMA NASCIMENTO DE SOUZA

Imunodiagnóstico da infecção por *Strongyloides stercoralis* em pacientes alcoolistas

Salvador, Bahia, 27 de fevereiro de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Neci Matos Soares – Universidade Federal da Bahia

Prof.Dr. Alan de Lencastre de Melo – Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Alverne Passos Barbosa – Universidade Federal de Goiás

Prof.Dr. Wasghinton Luis Conrado dos Santos – Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz-BA)

Prof. Dr. Ricardo Wagner Dias Portela – Universidade Federal da Bahia

*Dedico esta tese a meus pais, que
apesar da pouca formação acadêmica,
me ensinaram a lição mais importante
do mundo: nunca desistir.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, meus pais (Pedro e Luzia) e meus irmãos (Sergio, Adelson e Adilson), pelo apoio incondicional ao longo de toda a minha vida.

À professora Neci, pela paciência, compreensão e por todos os ensinamentos que possibilitaram meu amadurecimento científico, intelectual e pessoal nos últimos 11 anos. Obrigada pela confiança em minha capacidade e por me guiar ao longo dessa jornada.

À professora Márcia, pela disposição e boa vontade em ajudar, sempre.

À equipe do Laboratório de Extensão em Parasitologia, Joelma, Rosana, Marcos, Lúcia, Valbete e Mari, por sempre se disponibilizarem a ajudar, quando necessário.

À equipe do Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Nilo, Cintia, Daniel, Alana e Irlana pela ajuda e momentos de descontração.

À Wéslei e Larissa, a quem me refiro como mínions, e que vestiram a camisa do projeto, me acompanhando nos experimentos aos finais de semana.

Aos amigos Flávia, Mônica, Renata e Bruno, que ao longo desses anos, tornaram-se companheiros valiosos.

À Bete, que de companheira de pesquisa se tornou uma irmã.

À equipe do Laboratório de Saúde Pública (LASP) da Fiocruz, Prof Fernanda, Luana e Barbára, que tiveram paciência para me ensinar e acompanhar.

À equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias do Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Sukwan, John e Yang, por me receber de braços abertos, sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos da Villa International, Galileu, Karime, Carol, Flávia e Lourdes. Sem vocês, com certeza, tudo seria muito mais difícil.

A equipe e aos pacientes do Centro de Acolhimento e Tratamento de Alcoolistas (CATA), pela colaboração valiosa. Sem vocês, nada aconteceria.

Ao PIOS e a CAPES, que tornaram possível mais esta etapa.

Um agradecimento especial à professora Lêda, minha primeira orientadora e a primeira pessoa a me apresentar a parasitologia.

A todos os amigos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que eu chegasse até aqui.

A Deus, por tornar tudo isso possível.

*“Eu vou desdizer
Aquilo tudo que eu lhe disse antes
Eu prefiro ser
Essa metamorfose ambulante
Do que ter aquela velha opinião
Formada sobre tudo”
(Raul Seixas)*

De SOUZA, Joelma Nascimento. **Imunodiagnóstico da infecção por *Strongyloides stercoralis* em pacientes alcoolistas**. 134f. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil, 2018.

RESUMO

Introdução. A infecção por *S. stercoralis*, geralmente, cursa de forma crônica e assintomática. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio no sistema imune do hospedeiro, esta parasitose pode evoluir para os quadros graves de hiperinfecção e/ou disseminação. O alcoolismo crônico é um dos fatores de risco mais associado a estes quadros. **Objetivo.** Avaliar o immunoblotting e o ELISA para diagnóstico da infecção por *S. stercoralis* em pacientes alcoolistas, utilizando diversos preparados antigênicos frente a diferentes isotipos de anticorpos. **Materiais e métodos.** Foram incluídos no estudo pacientes alcoolistas crônicos internados no Centro de Acolhimento e Tratamento de Alcoolistas (CATA), sendo realizados exames parasitológicos de fezes (sedimentação espontânea, Baermann-Moraes e Cultura em Placa de Agar) e ELISA para detecção de anticorpos IgG, IgE e IgA1 em todos os indivíduos. O IgG1 e IgG4-ELISA só foram realizados nos pacientes com eliminação de larvas nas fezes. O immunoblotting foi realizado utilizando os antígenos solúveis de *S. stercoralis* (SsS) e *S. venezuelensis* (SvS), de membrana de *S. venezuelensis* (SvM) e os recombinantes NIE e SsIR combinados para os anticorpos IgG e IgA1 em 50 soros de indivíduos alcoolistas, sendo 20 infectados com *S. stercoralis*, 15 monoparasitados com outros helmintos e 15 negativos para qualquer enteroparasitose. Apenas as bandas com sensibilidade e especificidade superiores a 70% foram consideradas para o diagnóstico. **Resultados.** A imunorreatividade do immunoblotting variou de acordo com o isotipo do anticorpo pesquisado e antígenos utilizados. O antígeno de membrana de *S. venezuelensis* demonstrou sensibilidades de 100% (20/20) na pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgA1 e especificidades de 90 (27/30) e 93% (28/30), respectivamente, demonstrando melhor aplicabilidade diagnóstica. Os antígenos solúveis homólogo e heterólogo demonstraram sensibilidade e especificidade similares quando marcados tanto com IgG quanto com IgA1, sendo inferiores ao antígeno de membrana heterólogo para ambos os anticorpos. Os antígenos recombinantes demonstraram baixas especificidades, com elevado número de reações cruzadas. O SsIR foi o recombinante com maior número de reações cruzadas, 86,7% (13/15) para ambos os anticorpos. A reatividade aos anticorpos IgG e IgA1 para os diferentes preparados antigênicos demonstrou bandas com um peso molecular variando de 7 a 170 kDa e 14 a 170 kDa, respectivamente. No SsS, a única banda com mais de 70% de ambas sensibilidade e especificidade, tanto com IgG quanto IgA1, foi a de 26 kDa. Tanto no SvS quanto no SvM, foi observado um número maior de bandas com marcação para ambos o IgG e o IgA1. As bandas de 75 e 26 kDa do SvM apresentaram as maiores sensibilidades e especificidades para marcação com IgG e IgA1, sendo que a banda de 26 kDa apresentou sensibilidade em 100%, para ambos os anticorpos, e especificidade de 90 e 97% para o IgG e IgA1, respectivamente. Esta banda quando marcada para o IgA1 demonstrou as maiores sensibilidade e especificidade e a menor diferença entre ambas. Ao final do estudo foram avaliados um total de 345 pacientes. A frequência da infecção por *S. stercoralis* através dos métodos parasitológicos foi de 21,4%. A sensibilidade e especificidade dos ELISAs variaram de acordo com as diferentes classes e subclasses de anticorpos pesquisadas, sendo as maiores observadas no IgG4 e no IgE-ELISA, com 96 e 93% e 94 e 92%, respectivamente. No entanto, a imunorreatividade do IgE em

pacientes alcoolistas com eliminação de larvas nas fezes foi de apenas 70%, indicando que o IgE-ELISA é um método com baixa sensibilidade para o diagnóstico da estrogiloidíase nestes pacientes. O IgA1 e o IgG4-ELISA foram os melhores métodos para detecção de anticorpos em pacientes alcoolistas com eliminação de larvas nas fezes, 80% e 85%, respectivamente. A média da densidade óptica do IgG1 específico no soro de pacientes alcoolistas infectados com *S. stercoralis* foi significativamente menor em relação a indivíduos não-alcoolistas infectados ($p < 0.05$). Além disso, apenas 57% dos alcoolistas com eliminação de larva nas fezes foram positivos para o IgG1-ELISA e uma correlação negativa significativa ($r = -0.273$, $p < 0.05$) foi observada entre os níveis de IgG1 anti-*S. stercoralis* e a carga parasitária. Cerca de 92% dos pacientes alcoolistas com eliminação de larvas nas fezes e ELISA negativo para uma ou mais classes ou subclasses de anticorpos demonstraram imunorreatividade no immunoblotting para IgA1 utilizando o antígeno de membrana de *S. venezuelensis*, confirmando a presença de anticorpos específicos circulantes. **Conclusão.** O antígeno de membrana de *S. venezuelensis* apresentou melhor aplicabilidade para o diagnóstico da infecção por *S. stercoralis*, sendo que a pesquisa de anticorpos IgA1 apresenta melhor especificidade que a pesquisa de IgG, evidenciando que as moléculas na faixa de 17, 26, 75 e 90 kDa do antígeno de membrana do *S. venezuelensis* podem ser usadas como padrões no diagnóstico da estrogiloidíase, além de serem potenciais candidatas para desenvolvimento de uma proteína recombinante. O IgG1 e o IgE-ELISA demonstraram elevadas sensibilidades e especificidades, mas uma baixa reatividade em pacientes alcoolistas. Além do mais, foi observado um aumento estatisticamente significativo na carga parasitária dos alcoolistas infectados com *S. stercoralis* e IgE e IgG1-ELISA negativos. Em pacientes alcoolistas, o IgG4 e o IgA1-ELISA apresentaram os melhores resultados entre os ELISAs avaliados. O immunoblotting confirmou a infecção por *S. stercoralis* em 92% dos pacientes com eliminação de larvas nas fezes, mas negativos para uma ou mais classes ou subclasses de anticorpos no ELISA. Este trabalho abre um precedente para estudos futuros no uso de diferentes classes e subclasses de anticorpos para diagnóstico e avaliação da resposta imune na infecção por *S. stercoralis* e levanta a necessidade do desenvolvimento de antígenos recombinantes voltados para o diagnóstico da estrogiloidíase em grupos de risco em áreas endêmicas.

Palavras-chave: *Strongyloides stercoralis*. Imunodiagnóstico. Imunorreatividade. Alcoolistas.

SOUZA, Joelma Nascimento de. ***Strongyloides stercoralis* infection immunodiagnosis in alcoholic patients.** 131 pages. PhD Thesis. Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, 2018.

ABSTRACT

Introduction. *Strongyloides stercoralis* infection is usually chronic and asymptomatic. However, when an impairment occurs in the host's immune system, this parasite disease may develop into severe conditions of hyperinfection and/or dissemination. Chronic alcoholism is one of the risk factors most associated with these clinical conditions. **Aim.** To evaluate the immunoblotting and ELISA for *S. stercoralis* infection diagnose in alcoholic patients using several antigenic preparations with different antibodies isotypes. **Materials and methods.** There were included in this study alcoholic patients admitted in the Centro de Acolhimento e Tratamento de Alcoolistas (CATA). Stool tests (spontaneous sedimentation, Baermann-Moraes and Agar Plate Culture) and ELISA for the detection of specific IgG, IgE and IgA1 were performed in all individuals. IgG1 and IgG4-ELISA were only made in patients diagnosed with *S. stercoralis*. Immunoblotting was performed using the soluble *S. stercoralis* (SsS) and *S. venezuelensis* (SvS) antigen, *S. venezuelensis* membrane antigen (SvM) and the combined NIE and SsIR recombinants antigens for IgG and IgA1 detection in 50 alcoholics sera, 20 being infected with *S. stercoralis*, 15 monoparasitized with other helminths and 15 negative for any enteroparasitosis. Only bands with sensitivity and specificity greater than 70% were considered for diagnosis. **Results.** The immunoblotting immunoreactivity varied according to the antibody isotype and antigens used. *S. venezuelensis* membrane antigen demonstrated sensitivity of 100% (20/20) in both IgG and IgA1 antibody tests and specificities of 90 (27/30) and 93.3% (28/30), respectively, demonstrating better diagnostic applicability. Homologous and heterologous soluble antigens demonstrated similar sensitivity and specificity when tested to IgG and IgA1, being lower than the heterologous membrane antigen for both antibodies. The recombinant antigens demonstrated low specificities, with a high number of cross-reactions. SsIR was the recombinant with the greatest number of cross-reactions, 86.7% (13/15) for both IgG and IgA1. IgG and IgA1 reactivity to the different antigenic preparations presented bands with a molecular weight ranging from 7 to 170 kDa and 14 to 170 kDa, respectively. In SsS, the only band with more than 70% of both sensitivity and specificity to both IgG and IgA1 was at 26 kDa. In both SvS and SvM, a greater number of bands were observed for IgG and IgA1 compared to SsS. The 75 and 26 kDa bands of SvM presented the highest sensitivities and specificities for IgG and IgA1, with the 26 kDa band presenting 100% sensitivity for both antibodies, and specificity of 90 and 96.7% for IgG and IgA1, respectively. This band, for IgA1, demonstrated the highest sensitivity and specificity and the smallest difference between the two. At the end of the study, a total of 345 patients were evaluated. *S. stercoralis* infection frequency by parasitological methods was 21.4%. The ELISAs sensitivity and specificity varied according to the different classes and subclasses of antibodies tested, with the highest levels observed in IgG4 and IgE-ELISA, with 96 and 93% and 94 and 92%, respectively. However, the IgE immunoreactivity in alcoholic patients with fecal larvae elimination was only 70%, indicating that IgE-ELISA is a method with low sensitivity for strongyloidiasis diagnosis in these patients. IgA1 and IgG4-ELISA detected the highest antibodies frequency in alcoholic patients with faecal larvae elimination, 80% and 85%, respectively. The mean optical density of specific IgG1 in

the serum of alcoholic patients infected with *S. stercoralis* was significantly lower in relation to infected non-alcoholic individuals ($p < 0.05$). In addition, only 57% of alcoholics with faecal larvae excretion were positive for IgG1-ELISA and a significant negative correlation ($r = -0.273$, $p < 0.05$) was observed between anti-*S. stercoralis* IgG1 levels and the parasite load. Approximately 92% of alcoholic patients with elimination of larvae in feces and negative ELISA for one or more classes or subclasses of antibodies demonstrated immunoreactivity in immunoblotting for IgA1 using *S. venezuelensis* membrane antigen, confirming the presence of specific circulating antibodies. **Conclusion.** *S. venezuelensis* membrane antigen presented better applicability in the immunoblotting for *S. stercoralis* infection diagnosis and the IgA1 antibody screening has a specificity than IgG screening, showing that the bands at 17, 26, 75 and 90 kDa can be used as molecular patterns in *S. stercoralis* diagnosis and it also are potential candidates for recombinant antigen production. IgG4 and IgE-ELISA demonstrated a high sensitivities and specificities, however a low reactivity in alcoholic patients. Moreover, it was observed a statistically significant increase in the parasite load of alcoholic patients infected with *S. stercoralis* and IgE and IgG1-ELISA negative. In alcoholic patients, IgG4 and IgA1-ELISA presented the best results among the evaluated ELISAs. Immunoblotting confirmed *S. stercoralis* infection in 92% of patients with elimination of fecal larvae but negative for one or more classes or subclasses of antibodies in the ELISA. This work sets a precedent for future studies in the use of different antibodies classes and subclasses for *S. stercoralis* diagnosis and immune response evaluation and raises the need for more studies in the development of recombinant antigens for strongyloidiasis diagnosis in risk groups of endemic areas.

Key words: *Strongyloides stercoralis*. Immunodiagnostic. Immunoreactivity. Alcoholics.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 3

Figura 1. Immunoblotting utilizando antígenos solúveis de *S. stercoralis* (1) de *S. venezuelensis* (2), de membrana de *S. venezuelensis* (3) e os antígenos recombinantes NIE-SsIR (4) marcados com IgG (A) e IgA1 (B).....48

CAPÍTULO 4

Figura 1. ELISA para detecção de níveis séricos de IgG, IgE e IgA1 anti- *S. stercoralis* em pacientes atendidos do CATA e no LACTFAR, UFBA. 100 indivíduos não alcoolistas: 50 infectados com *S. stercoralis* (▲); 20 infectados com outras parasitoses intestinais (■); 30 adultos aparentemente saudáveis, com exame parasitológico negativo (●). 345 pacientes alcoolistas: 74 infectados com *Strongyloides stercoralis* (▼); 271 de pacientes sem infecção por *S. stercoralis* (◆). Curva ROC indicando sensibilidade, especificidade, ponto de corte e área sob a curva ROC (AUC) para detecção de IgG, IgE e IgA1 específicos.....64

Figura 2. ELISA para detecção de níveis séricos de IgG1 (A) e IgG4 (B) anti- *S. stercoralis* em soros de pacientes atendidos no CATA e na Faculdade de Farmácia, UFBA. 55 não alcoolistas, sendo 25 infectados com *S. stercoralis* (▲); 10 monoparasitados com outras parasitoses intestinais; 20 de indivíduos adultos saudáveis (■) e 74 pacientes alcoolistas infectados com *S. stercoralis*. Curva ROC indicando sensibilidade, especificidade, ponto de corte e área sob a curva ROC (AUC) para detecção de IgG1 (A1) e IgG4 (B1) em amostras de soro.....65

Figura 3. Média e desvio padrão da carga parasitária em alcoolistas com eliminação de larvas de *S. stercoralis* nas fezes (n=74) positivos ou negativos para os diferentes isotipos de anticorpos específicos no ELISA.....66

Figura 4. Representação do Immunoblotting para detecção de IgA1 anti-*S. stercoralis* usando antígeno de membrana de *S. venezuelensis* e soros de pacientes com resultado parasitológico positivo, mas negativo no ELISA para detecção de uma ou mais classes de anticorpos (n=36). Controles negativo e positivo 1 e 2. Bandas específicas nas regiões de 90, 75, 26 e 17 kDa.....67

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Sensibilidade e especificidade do immunoblotting utilizando diferentes preparados antigênicos.....46

Tabela 2. Sensibilidade e especificidade do immunoblotting dos antígenos brutos solúveis de *S. stercoralis* (SsS) e *S. venezuelensis* (SvS), do antígeno de membrana de *S. venezuelensis* (SvM) e dos antígenos recombinantes IE-SsIR de acordo com a reatividade aos anticorpos IgG e IgA1.....49

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Avaliação dos níveis de anticorpos específicos IgG, IgE, IgA, IgG1 e IgG4 em pacientes infectados com *S. stercoralis* alcoolistas (n=74) e não alcoolistas (n=50 para IgG, IgE e IgA1 e n=25 para IgG1 e IgG4) e alcoolistas não infectados (n=271) e correlação entre a densidade óptica e a carga parasitária nos pacientes alcoolistas (n=74).....66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BM – Baermann-Moraes	Th2 – Células T Helper 2
CPA - Cultura em Placa de Agar	Treg – Células T regulatórias
D.O. – Densidade óptica	WB – Western Blotting
DAB - 3,3'- Diaminobenzidine	
ELISA – Ensaio imunoenzimático	
HTLV-1 - Vírus Linfotrópico de células T do tipo 1	
IB - Immunoblotting	
IFAT – Imunofluorescência indireta	
IL - Interleucinas	
Ig - Imunoglobulina	
LAMP - ensaio de amplificação isotérmica de DNA mediada por loop	
LIPS - Imunoprecipitação de luciferase	
PAC - Programa de Aceleração do Crescimento	
PBS - Tampão fosfato salina	
PCR - Reação em cadeia da polímeras	
Qsp - Quantidade Suficiente Para	
ROC - Receiver operating characteristic	
SsS – <i>S. stercoralis</i> solúvel	
SvM - <i>S. venezuelensis</i> membranas	
SvS - <i>S. venezuelensis</i> solúvel	
SDS – PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio	
TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta	
Th1 – Células T Helper 1	

SUMÁRIO

CAPITULO 1.....	16
1.1 INTRODUÇÃO.....	17
1.2 OBJETIVOS.....	19
1.2.1 <i>Objetivo Geral</i>	19
1.2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	19
CAPITULO 2.....	20
2.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1.1 <i>Strongyloides stercoralis</i>	21
2.1.2 <i>Epidemiologia</i>	22
2.1.3 <i>Resposta imune</i>	25
2.1.4 <i>Quadro clínico</i>	27
2.1.5 <i>Comorbidade entre a estrogiloidíase e o alcoolismo</i>	29
2.1.6 <i>Diagnóstico</i>	30
2.1.7 <i>Tratamento</i>	33
CAPÍTULO 3	
AVALIAÇÃO DO IMMUNOBLOTTING PARA DIAGNÓSTICO DA INFECCÃO POR <i>Strongyloides stercoralis</i>	36
3.1 INTRODUÇÃO.....	41
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.2.1 <i>Casuística</i>	42
3.2.2 <i>Produção de antígeno</i>	42
3.2.3 <i>Diagnóstico Parasitológico</i>	43
3.2.4 <i>SDS-PAGE e immunoblotting</i>	43
3.2.5 <i>Análises estatísticas</i>	44
3.3 RESULTADOS.....	45
3.4 DISCUSSÃO.....	48
CAPÍTULO 4	
DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE EM PACIENTES ALCOOLISTAS BASEADO NA IMUNORREATIVIDADE A DIFERENTES ISOTIPOS DE ANTICORPOS.....	52
4.1 INTRODUÇÃO.....	56

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.2.1 Casuística.....	57
4.2.2 Produção de antígeno.....	57
4.2.3 ELISA para detecção de anticorpos específicos.....	58
4.2.4 SDS-PAGE e immunoblotting.....	59
4.2.5 Análise estatística.....	60
4.3 RESULTADOS.....	60
4.4 DISCUSSÃO.....	66
CAPÍTULO 5	
CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	71
ANEXOS.....	89
ANEXO A: Influence of parasite load on the diagnosis and occurrence of eosinophilia in alcoholic patients infected with <i>Strongyloides stercoralis</i>	90
ANEXO B: Alterations in serum paraoxonase-1 activity and lipid profile in chronic alcoholic patients infected with <i>Strongyloides stercoralis</i>	96
ANEXO C: <i>Strongyloides stercoralis</i> Infection in Alcoholic Patients.....	103
ANEXO D: Parecer do Comitê de Ética.....	115
ANEXO E: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	120

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

Strongyloides stercoralis é o principal agente etiológico da estrogiloidíase humana. Apresentando uma distribuição heterogênea, pode ser encontrado em todas as regiões do planeta, infectando cerca de 300 milhões de pessoas em todo o mundo (1). *S. fuelleborni*, outra espécie do mesmo gênero, é encontrada esporadicamente na África e Papua Nova Guiné, onde foi reportada como causa de diarreia em crianças (2). A estrogiloidíase é endêmica no Sudeste Asiático, América Latina, África Subsaariana e Sudeste dos Estados Unidos (3–5), onde as baixas condições socioeconômicas e sanitárias, aliadas ao solo, clima e temperatura adequados, permitem que o parasito permaneça no ambiente (5). A principal forma de transmissão da infecção por *S. stercoralis* ocorre através da via transcutânea, pela penetração de larvas filarióides infectantes no hospedeiro (6). Uma das características mais peculiares deste parasito é a sua capacidade de se multiplicar no interior do indivíduo, uma vez que as larvas podem alcançar o estágio filaróide ainda no intestino e reiniciar o ciclo parasitário, fenômeno conhecido como autoinfecção. A autoinfecção permite que o parasito permaneça no hospedeiro durante décadas, sem necessidade de uma reinfecção exógena, produzindo sintomas mínimos (7,8).

Estudos sugerem que tanto a resposta imune inata quanto adaptativa possuem papéis importantes na resistência à infecção por *Strongyloides* (9). A resposta inata é mediada, principalmente, por eosinófilos e pela interleucina-5 (IL-5), com neutrófilos e macrófagos exercendo papéis acessórios na eliminação do parasito (9,10). O sistema imune adaptativo envolve especificamente respostas do tipo 2, com células Th2 secretoras de IL-4, IL-5 e IL-13 e produção de imunoglobulinas (IgE, IgG, IgA e IgM) (11). Em contraste, as células T regulatórias auxiliam a modular a resposta Th2 exacerbada (12), sendo a interação entre as células Th1, Th2 e Treg cruciais para a defesa contra o parasito (13). Apesar de existirem poucos trabalhos sobre essas respostas na infecção humana, estudos demonstram que determinadas condições, que levam a um desequilíbrio no sistema imune, podem deixar o indivíduo mais susceptível a desenvolver os quadros graves da estrogiloidíase, hiperinfecção e disseminação (14–17).

A hiperinfecção é caracterizada pelo aumento da excreção de parasitos nas fezes e/ou escarro, em conjunto com a exacerbção de sintomas envolvendo os tratos gastrointestinal e respiratório, como náusea, vômito, diarreia e dificuldade em respirar (18). No entanto, apesar do número elevado de parasitos, estes estão confinados nos locais onde ocorre o ciclo de autoinfecção (19,20). Quando o helminto é encontrado em outros órgãos, o quadro passa a ser

conhecido como estrogiloidíase disseminada e, nestes casos, as larvas podem ser encontradas no cérebro, fígado, rins, pâncreas e, potencialmente, qualquer outro órgão (20,21). Os indivíduos mais afetados são os pacientes imunocomprometidos, principalmente, quando coinfectados com o Vírus Linfotrófico de Células T do tipo 1 (HTLV-1) (22–24), em uso crônico de glicocorticoides (25,26) e alcoolistas (20,27). Estudos demonstram que a frequência da infecção por *S. stercoralis* em pacientes alcoolistas varia em torno de 20% (27–29), chegando a 40% quando associada a cirrose hepática (30,31). As possíveis causas desta comorbidade incluem o aumento da exposição aos fatores de risco à infecção por *S. stercoralis*, alterações das vilosidades intestinais, estímulo da autoinfecção pelos metabólitos do cortisol e comprometimento da resposta imune (32). Um estudo recentemente publicado por nosso laboratório demonstrou que o aumento do nível de cortisol endógeno está diretamente relacionado com o aumento do número de larvas excretadas nas fezes (27).

Atualmente, o diagnóstico da estrogiloidíase depende da detecção de larvas em amostras de fezes. Entre os métodos parasitológicos existentes, os mais sensíveis são a Cultura em Placa de Agar (CPA) e o Baermann-Moraes. Apesar da CPA ser mais sensível, é menos utilizado que o Baermann-Moraes, pois é mais complexa e demanda um tempo maior para liberação dos resultados, além de ter um custo mais elevado (33). Contudo, mesmo ao utilizar-se o método parasitológico mais sensível, a influência da intermitência e da quantidade de larvas liberadas nas fezes e do número, do armazenamento e da manipulação das amostras, alteram a eficácia do teste (34). Os métodos imunológicos para a pesquisa de anticorpos podem ser uma importante ferramenta no suporte ao diagnóstico da estrogiloidíase (35,36). No entanto, seu uso ainda é limitado pela dificuldade na produção do antígeno homólogo, presença de reações cruzadas com outros parasitos e memória imunológica, que dificulta a diferenciação entre uma infecção passada e uma recente (35,37). Desta forma, o desenvolvimento de antígenos recombinantes com elevadas sensibilidade e especificidade, que permita a produção em massa, e a avaliação de novas técnicas para o imunodiagnóstico são de extrema importância para superar as dificuldades ainda encontradas, de forma que o diagnóstico possa ser rápido e preciso.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o immunoblotting e o ELISA para diagnóstico da infecção por *S. stercoralis* em pacientes alcoolistas utilizando diversos preparados antigênicos frente a diferentes isotipos de anticorpos.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Comparar a sensibilidade e especificidade dos antígenos solúveis de *S. stercoralis* e *S. venezuelensis*, do antígeno de membrana de *S. venezuelensis* e dos antígenos recombinantes NIE e SsIR no immunoblotting para detecção de anticorpos IgG e IgA1 anti-*S. stercoralis*.
2. Determinar a frequência da infecção por *S. stercoralis* em pacientes alcoolistas internados no Centro de Acolhimento e Tratamento de Alcoolistas (CATA) das Obras Sociais Irmã Dulce (OSID);
3. Definir os níveis de anticorpos específicos IgG, IgE e IgA1 no soro de pacientes alcoolistas;
4. Avaliar os níveis das subclasses IgG1 e IgG4 específicas nos pacientes alcoolistas infectados com *S. stercoralis*;
5. Realizar o immunoblotting utilizando o antígeno de membrana de *S. venezuelensis* para pesquisa de anticorpos IgA1 em pacientes alcoolistas com liberação de larvas nas fezes e ELISA negativo para uma ou mais classes de anticorpos.

CAPÍTULO 2

2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1.2 *Strongyloides stercoralis*

O gênero *Strongyloides* está classificado na ordem Rhabditida e a maioria das suas 52 espécies são nematódeos microbívoros que não infectam seres humanos. Além de *S. stercoralis* e *S. fuelleborni*, mais duas espécies, *S. myopotami* e *S. procyonis*, infectam hospedeiros animais e podem ser responsáveis por infecções zoonóticas (3). O *Strongyloides stercoralis* ocorre naturalmente em cachorros, primatas e seres humanos (5). É o principal agente etiológico da estrogiloidíase humana e apresenta ampla distribuição mundial (5,38). A primeira descrição do parasito foi realizada em 1876 por Loius Normand, que detectou larvas em fezes diarreicas de soldados franceses que retornavam da antiga região da Indochina e, por esse motivo, a doença ficou conhecida por muitos anos como “diarreia da Cochinchina” (39). No mesmo ano, Normand encontrou a forma adulta do *S. stercoralis* durante uma autópsia, apesar de inicialmente não ter relacionado as duas formas evolutivas ao mesmo parasito (40). O nome *Strongyloides* deriva do grego, sendo que “strongylos” significa redondo e “eidos” similar (41). Passou-se mais de um século, após a sua descoberta, para se entender a biologia e as características que tornam este parasito tão peculiar e importante para a saúde pública (3).

A transmissão da infecção por *S. stercoralis* ocorre principalmente através da via cutânea, onde as larvas do helminto, presentes em solo contaminado, atravessam a pele do hospedeiro (42). No entanto, a alta prevalência da infecção em indivíduos institucionalizados levanta a hipótese de rotas alternativas de transmissão (43–45). Relatos de casos reportam a transmissão da infecção após o transplante de órgãos e através de sexo anal e oral, no entanto estas vias ocorrem raramente e não representam vias significativas (40,46–49). O *S. stercoralis* apresenta um duplo ciclo evolutivo, parasitário (ou direto) e de vida livre (42). Esse desenvolvimento heterogêneo funciona como um mecanismo de amplificação do parasito, permitindo sua reprodução no ambiente e elevando suas chances de sobrevivência. Os determinantes que definem este tipo de desenvolvimento ainda não estão completamente esclarecidos. Alguns autores acreditam que a diferenciação é geneticamente determinada na formação do ovo, onde haveria diferenças no número de cromossomos das formas parasitárias e de vida livre, sugerindo que as fêmeas partenogênicas seriam triploides (3n), produzindo simultaneamente três tipos de ovos, triploides (3n), diploides (2n) e haploides (n) (50). As larvas rhabditoides triploides (3n) originariam larvas filarióides infectantes, completando o ciclo direto, enquanto que as diploides e haploides se transformariam em fêmeas e machos de

vida livre, respectivamente, dando origem ao ciclo de vida livre. Entretanto, alguns estudos não confirmam a diferença de ploidia e indicam que todas as formas evolutivas do *Strongyloides* são diploides (51), sendo o sexo do parasito determinado geneticamente. Neste caso, a diferenciação entre fêmeas partenogênicas e de vida livre ocorreria posteriormente, em decorrência de mudanças na expressão gênica, que poderia ser influenciada pela resposta imune do hospedeiro, disponibilidade de nutrientes, temperatura do ambiente, entre outros fatores (52,53).

A fêmea partenogênica pode viver no intestino delgado humano por até cinco anos, liberando os ovos na mucosa intestinal. Ainda no hospedeiro, os ovos eclodem e liberam a larva rabditoide, que é eliminada nas fezes (5,42). Portanto, raramente observam-se ovos no diagnóstico parasitológico (54). No meio ambiente, sob condições adequadas de luz, temperatura e umidade, as larvas rabditoides evoluem para a forma filaróide infectante (L3) ou para as formas adultas de vida livre, sendo estas as únicas capazes de se reproduzirem sexualmente. Após a cópula, a fêmea de vida livre libera ovos que irão se transformar exclusivamente em larvas infectantes (42). No ambiente, essas larvas não evoluem e só reiniciam seu desenvolvimento ao encontrar um hospedeiro adequado. Dessa forma, existe apenas uma única geração de adultos de vida livre (41). Após as larvas atravessarem a pele, migram através da circulação, chegando aos pulmões, onde sofrem ecdise e são carregadas passivamente com o muco até o intestino delgado, se estabelecendo e alcançando o estágio evolutivo final, fêmea partenogênica, e completando o ciclo (41).

Algumas larvas rabditoides podem evoluir para a forma filaróide ainda no interior do hospedeiro, fazendo a penetração intraluminal no intestino (autoinfecção interna) ou cutânea, na região perianal (autoinfecção externa), o que permite a manutenção da infecção e aumenta o número de parasitos no hospedeiro sem que ocorra reinfecção exógena (55–57). No indivíduo imunocompetente, o sistema imune regula a reprodução dos parasitos, limitando a autoinfecção. No entanto, quando ocorre uma alteração na capacidade de resposta imune do hospedeiro, este helminto pode se multiplicar rapidamente, resultando nos quadros conhecidos como hiperinfecção e/ou disseminação, os quais apresentam uma alta taxa de mortalidade (5). A falta de diagnóstico adequado torna a strongiloidíase uma das doenças negligenciadas com menos aporte financeiro e investimento por parte de instituições governamentais, sendo excluída da lista de prioridades devido a uma subestimação de sua real prevalência (40).

2.1.2 Epidemiologia

O *Strongyloides stercoralis* é endêmico em regiões tropicais e subtropicais (5), cuja alta prevalência está associada ao subdesenvolvimento social e econômico, onde fatores como a falta de saneamento básico e as baixas condições de higiene, associadas com as condições adequadas de temperatura e umidade são fatores determinantes para a manutenção do parasito no ambiente (5,38). Em algumas regiões da África e Papua Nova Guiné, foram reportados casos de estrogiloidíase causados por *S. fuelleborni fuelleborni* e *S. fuelleborni kelleyi* (2,5,58). Esta infecção parasitária é zoonótica e rara em humanos, com os primeiros casos de infecção relatados na Zâmbia (59). No entanto, em regiões onde há contato frequente entre humanos e primatas, a zoonose pode ser um potencial problema de saúde pública (40). Estima-se que entre 30 a 100 milhões de pessoas estejam infectadas com *Strongyloides* em todo o mundo (1,55). No entanto, a prevalência é subestimada devido à baixa sensibilidade dos métodos de diagnóstico utilizados. A estimativa mais precisa aponta para cerca de 300 milhões de pessoas infectadas (4,20,60,61), sendo possível classificar a prevalência em três categorias: esporádica (< 1%), endêmica (1 – 5%) e hiperendêmica (> 5%) (62).

Estudos epidemiológicos de base populacional são escassos e a maioria dos dados provém de trabalhos em grupos restritos tais como creches, hospitais e bairros, o que dificulta estimativas acuradas. No entanto, em áreas onde o solo é úmido e existe a disposição inadequada de resíduos humanos, como na África Ocidental, Caribe, Sudeste da Ásia, regiões tropicais do Brasil, Camboja e regiões temperadas da Espanha, as taxas de prevalência da estrogiloidíase são bastante elevadas (63). Na África, a prevalência varia de 0,1% na África Central a 91,8% no Gabon. No Sudeste Asiático, muitos países possuem altas taxas de infecção, sendo as maiores registradas na Malásia (35,9%) e as menores no Vietnã (0,1%). Camboja, China, Indonésia, República Democrática Popular Lau e Tailândia apresentam uma frequência variando de 6 a 30% (64). Focos da infecção já foram registrados em regiões de clima temperado, como Japão, Itália, Austrália e Estados Unidos da América (EUA) (4,5). Em países desenvolvidos, a população em risco é composta, principalmente, por imigrantes, refugiados, veteranos de guerra, turistas, pacientes imunocomprometidos e fazendeiros (4,38). Em um estudo conduzido na Itália com imigrantes e nativos, a frequência encontrada foi de 5% (65). No Japão, a infecção é endêmica na ilha de Okinawa, onde há muito tempo foram identificados níveis elevados em associação com a infecção pelo HTLV-1, com prevalência entre 13,6 a 18,7% (4).

Na América do Sul, estudos independentes realizados na Amazônia Peruana, demonstraram elevadas prevalências de *S. stercoralis*, variando de 6,6 a 19,5% (66–68). As maiores frequências na América do Sul foram identificadas na Argentina, com taxas que

variam de 22 a 50% (69–71). No equador, foi encontrada uma frequência variando de 0,7 a 24%, a depender da região e população estudada (68,72–74). Em uma revisão de literatura sobre a prevalência da infecção por *S. stercoralis* na América Latina, Buofrante e colaboradores apontaram que a prevalência no Chile, Venezuela, Colômbia e Honduras, varia de 2 a 24%. Os estudos de prevalência na Bolívia, Guatemala, México, Nicarágua e Porto Rico demonstraram prevalências inferiores a 2% (68).

No Brasil, as desigualdades sociais aliadas ao processo de urbanização desordenado, contribuíram para a precarização das condições de vida de uma grande parcela da população, o que reflete na elevada prevalência das parasitoses intestinais (75,76). Uma meta-análise com 43 estudos realizada por Schär et al. (2013), estimou que a prevalência da infecção por *S. stercoralis* no país é de 10,8%, sendo considerada uma área hiperendêmica (4). Em um estudo em Concórdia, Santa Catarina, a prevalência variou de 17 a 28% (77). Em Uberlândia, Minas Gerais, a frequência foi de 6,7%, em 180 indivíduos provenientes de uma zona rural (78). Em Holambra (São Paulo) e Maceió (Alagoas), a frequência da infecção foi de 11,3%, em 432 indivíduos, examinados por três métodos parasitológicos diferentes, incluindo a cultura em placa de agar (79). Na Bahia, a prevalência da infecção por *S. stercoralis* pode chegar a 6,6%, a depender dos métodos parasitológicos utilizados (33,80).

Uma alta prevalência foi descrita em indivíduos imunocomprometidos, estimada em 11,8% entre diferentes grupos (81). Chieffi et al. (2000) demonstraram que em um banco de sangue de São Paulo, 12,1% dos 91 doadores infectados pelo HTLV-1 estavam coinfectados com *S. stercoralis* (22). Em Belém (PA) foi encontrada uma prevalência de 14 e 11% nos pacientes infectados com o vírus HTLV-1 e 2, respectivamente (23). Em Salvador (BA), que apresenta umas das maiores prevalências da infecção por HTLV-1 do Brasil, a frequência de *Strongyloides* foi de 15,7% num grupo de 150 doadores de sangue infectados com o vírus (82). Na mesma cidade, a frequência da infecção por *S. stercoralis* em pacientes com lúpus foi de 1,3%, usando métodos parasitológicos (26). Em Porto Alegre (RS), de 16 pacientes adultos transplantados sintomáticos, 11 estavam infectados com *S. stercoralis*, dentre estes, três casos apresentaram hiperinfecção, incluindo um óbito (83). Em outro estudo realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em pacientes em tratamento de neoplasias hematológicas e sem terapia anti-helmíntica profilática, a prevalência de *S. stercoralis* foi 8,3% (84). No Rio de Janeiro, a frequência da infecção neste grupo de pacientes variou de 13 a 21 % (85,86).

Devido à natureza complexa da infecção por *S. stercoralis*, o diagnóstico precoce e a profilaxia do parasito devem ser metas da saúde pública (38). Em 2005, reconhecendo a

elevada prevalência da infecção no país, o governo brasileiro incluiu a estrogiloidíase no “Plano Nacional de Vigilância e Controle das Enteroparasitoses” e em 2007, no Programa de Aceleração do Crescimento (PAC), programas que executam ações de saneamento básico, objetivando a melhoria da qualidade de vida da população (81). Mesmo assim, a estrogiloidíase continua a ser um problema de saúde pública no país. A presença das comorbidades e o risco de desenvolvimento dos quadros graves, reforça a necessidade de estudos que tenham por objetivo compreender os mecanismos de controle da infecção baseados na resposta imune contra o parasito.

2.1.3 Resposta imune

Apesar da importância da infecção por *S. stercoralis* para a saúde pública e de seu potencial em desenvolver quadros graves, existem poucos estudos na literatura que avaliem a resposta imune dos hospedeiros frente a infecção por este parasito. A preservação da resposta Th2 no hospedeiro humano geralmente está associada a um bom prognóstico e alta eficácia do tratamento anti-helmíntico. Anuradha e colaboradores (2016) demonstraram um aumento da frequência de células Th2 mono e bifuncionais, em pacientes infectados com *S. stercoralis* tanto em homeostase quanto após a estimulação com antígeno (87), sendo estas alterações celulares revertidas após o tratamento. Em outro estudo, os mesmos autores demonstram que na infecção por *S. stercoralis* ocorre um aumento da produção de citocinas produzidas pelas células Th2, incluindo IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, como também de citocinas produzidas pelas células T regulatórias, IL-10 e TGF- β (88), sendo IL-10 a principal citocina na regulação das células Th1, Th2 e Th17, enquanto que o TGF- β desempenha um papel mais discreto na modulação das células Th1 e Th17 apenas. Esta dicotomia na regulação da resposta imune pelas citocinas reguladoras centrais pode refletir em diferentes fontes de produção ou modos de ação (87). Além disso, em 2016 foi demonstrado o aumento dos níveis de outras citocinas anti-inflamatórias, a IL-27 e a IL-37, com reversão significativa após a terapia (88). A principal função da IL-27 é suprimir a produção de IL-2 e regular negativamente a resposta Th17 (89). A IL-37 pertence à família de citocinas IL-1, mas, ao contrário dos outros membros desta família, desempenha uma função anti-inflamatória (90).

As interleucinas IL-4 e IL-5 estimulam a produção de IgE, que por sua vez induz a degranulação de mastócitos e secreção de muco pelas células caliciformes (14). A ação do muco em conjunto com a peristalse induzida por IL-4 e IL-13 facilita a expulsão do helminto, enquanto os grânulos tóxicos liberados pelos mastócitos atuam causando danos diretos ao parasito (91). A IL-13 também desempenha um papel importante na fibrose e na cicatrização

de feridas, ajudando a curar o dano tecidual causado pela migração do nematódeo (92). IL-4 e IL-5 também promovem a ativação de eosinófilos, que desempenha um papel crucial na defesa do hospedeiro. Os eosinófilos estão envolvidos diretamente na resposta imune inata, além de atuarem também na resposta imune adaptativa (14,93,94). Eles agem como células apresentadoras de antígeno, aumentam a produção de citocinas Th2 (incluindo IL-4 e IL-5) e a produção de anticorpos específicos (9,93,95). Além disso, a degranulação de eosinófilos e liberação de moléculas tóxicas na superfície do helminto através da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) induzem a morte do parasito. Apesar de ser um achado comum em todas as infecções helmínticas, em pacientes infectados com *S. stercoralis*, a eosinofilia é mais frequente, devido ao habitat das fêmeas partenogênicas, na submucosa intestinal e não no lúmen, o que resulta em um estímulo direto da resposta imune do hospedeiro (96,97). Aproximadamente 75% dos pacientes com estrogiloidíase crônica apresentam níveis elevados de eosinófilos ou IgE e sua ausência pode indicar um prognóstico ruim, particularmente em pacientes imunocomprometidos (98).

Estudos recentes mostram um novo subtipo de células TCD4+, as células Th9 (99). Esse subtipo celular é desenvolvido sob a estimulação de IL-4 e TGF- β e produz IL-9 e/ou IL-10 (100,101). A IL-9 estimula o crescimento, a proliferação e a sobrevivência das células T, aumenta a produção de IgE, promove a proliferação e diferenciação de mastócitos e progenitores hematopoiéticos e induz a secreção de muco e quimiocinas por células epiteliais da mucosa (99,99), sendo uma citocina importante em infecções da mucosa. Anuradha e cols. (2016) demonstraram um aumento antígeno-específico da frequência de células Th9 e Th2 produtoras de IL-9 em pacientes infectados com *S. stercoralis* (99). Ainda estes autores observaram que a IL-10 e o TGF β parecem desempenhar um papel importante na regulação da expansão das células Th9. No entanto, existem poucos dados sobre o padrão de expressão dessas células nos seres humanos e seu papel na defesa contra as infecções helmínticas.

O *Strongyloides* também pode estimular células Treg, um mecanismo de escape do parasito que suprime a resposta imune protetora do tipo Th2, deixando o indivíduo mais susceptível à infecção (102). Este fato é corroborado por estudos em indivíduos coinfectados com HTLV-1, que apresentam um nível elevado de citocinas Treg (103). Em um estudo em humanos, o aumento da expressão das células Treg em indivíduos coinfectados com HTLV-1 e *S. stercoralis* foi inversamente proporcional ao nível de IL-5 (12). Em um trabalho recente publicado por Ribeiro e cols., (2017) foi observada uma elevação da frequência de células Treg em pacientes infectados com *S. stercoralis* (104). Estudos com outros helmintos demonstram que as células Treg promovem a sobrevivência do parasito (105,106).

Indivíduos com estrogiloidíase desenvolvem anticorpos específicos dos isotipos IgG, IgE, IgM e IgA (16,17,107–109). A infecção induz uma rápida produção de anticorpos anti-*S. stercoralis* circulantes das classes IgE, IgG1, IgG2 e IgG3, seguido por um aumento nos níveis de IgG4, semanas ou meses após a infecção (55,110). Os títulos de IgG são notados duas semanas após a infecção, com um pico em torno da sexta semana, sendo a imunoglobulina alvo na maioria dos métodos de diagnóstico imunológicos (55,110). O habitat do parasito sugere que ele também estimule uma resposta local de anticorpos da classe IgA, detectáveis em amostras biológicas, como soro e saliva. A IgA é a segunda imunoglobulina sérica mais frequente, sendo a mais abundante nas mucosas e secreções (108,109,111,112). Na infecção por *S. stercoralis*, o IgA, possivelmente, inibe a fecundidade da fêmea partenogénica e a viabilidade dos ovos, limitando a quantidade de larvas eliminadas nas fezes (16,113). Os anticorpos da classe IgE se ligam aos receptores das células efectoras, especialmente mastócitos e basófilos, e induzem a degranulação e a liberação de mediadores inflamatórios, que levam à morte e à expulsão do verme adulto. Além disso, os mastócitos também liberam proteoglicanos, que estimulam a contração e dificultam o estabelecimento do parasito no epitélio intestinal (114–116). Por outro lado, IgE e IgG4 possuem como alvo de ligação os mesmo epitopos e assim o IgG4 pode atuar bloqueando a resposta mediada pela IgE (5,16).

Vários estudos sugerem que a capacidade dos helmintos de expressar e secretar moléculas imunorreguladoras para suprimir a resposta imune do hospedeiro lhes confere também a habilidade de modular a resposta imune contra outras infecções e morbidades, tais como doenças alérgicas e autoimunes (117–121). Existem poucos estudos avaliando a imunomodulação em hospedeiros coinfectados com *S. stercoralis* e outros patógenos. Em estudos publicados recentemente, indivíduos coinfectados com *S. stercoralis* e *Micobacterium tuberculosis* apresentaram uma alteração da resposta imune contra a bactéria (122–125). No entanto, estes dados são apenas preliminares e mais estudos são necessários para avaliar a resposta imune contra o *S. stercoralis* e seu efeito em doenças crônicas subjacentes.

2.1.4 Quadro clínico

De forma geral, a estrogiloidíase pode ser dividida em (1) aguda, (2) crônica e (3) severa, sendo esta última subdividida em hiperinfecção e disseminação. Na maioria dos pacientes (cerca de 60%), a estrogiloidíase cursa de forma assintomática ou oligossintomática, com potencial de evoluir para as formas graves de hiperinfecção e/ou disseminação em indivíduos imunocomprometidos (19). Na estrogiloidíase aguda, as

manifestações estão associadas à migração das larvas (5). No local da penetração pode haver irritação, seguida de edema e urticária. A passagem das larvas pelo pulmão pode desencadear bronquite, tosse seca, irritação traqueal e broncoespasmo (similar à síndrome de Leoffler), dor no peito, dispneia e hemoptise. Após o estabelecimento do parasito no intestino delgado, a infecção pode evoluir para um quadro crônico, que geralmente é assintomático. Quando ocorrem sintomas, estes geralmente estão confinados no trato gastrointestinal e respiratório e o indivíduo pode cursar com diarreia, dor abdominal, flatulência, síndrome de má absorção, perda de peso e, ocasionalmente, sangramento intestinal e obstrução do intestino delgado (estrongiloidíase intestinal). Quando presentes, as manifestações pulmonares variam de tosse seca e broncoespasmo (similar à síndrome de Leoffler) à dor no peito, dispneia e hemoptise. Casos mais graves podem desenvolver síndrome do desconforto respiratório do adulto (136). Manifestações dermatológicas tais como urticária, petéquias, erupções e *larva currens* também podem ocorrer (3). Manifestações incomuns tais como artrite (126), síndrome nefrótica (127), má absorção crônica (128), obstrução duodenal (129) e lesões hepáticas focais (130) já foram reportadas.

Em qualquer momento da infecção crônica, que pode durar décadas, o indivíduo pode evoluir para quadros graves de hiperinfecção e/ou disseminação. A hiperinfecção pode ser considerada uma forma grave de autoinfecção (20). A diferença entre hiperinfecção e autoinfecção é quantitativa e não está bem estabelecida. No entanto, a síndrome da hiperinfecção implica a presença de sinais e sintomas atribuíveis ao aumento do número de larvas e sua migração (5). Os sintomas gastrointestinais e cardiopulmonares são exarcebados. No entanto, alguns indivíduos podem permanecer assintomáticos (149). Quando o parasito é encontrado em localizações ectópicas, o quadro clínico passa a ser conhecido como disseminado. Os órgãos aos quais as larvas habitualmente alcançam são os linfonodos mesentéricos, a vesícula biliar, o fígado, o diafragma, o coração, o pâncreas, os músculos esqueléticos, os rins, os ovários e o cérebro (5,13). O grande número de larvas penetrando a parede intestinal pode carrear bactérias aderidas às suas superfícies, resultando em bacteremia polimicrobiana, sepse, meningite e morte (20). Comumente, os quadros severos da estrongiloidíase estão associados ao comprometimento da resposta imune do hospedeiro, especialmente a resposta Th2, podendo ser de origem iatrogênica, devido à ingestão de medicamentos imunossupressores (tais como glicocorticoides) ou subjacentes a uma doença secundária, como coinfeção com o vírus HLTV-1, diferentes tipos de câncer, transplante de órgãos, desnutrição, diabetes mellitus, doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência renal e alcoolismo. A estrongiloidíase severa apresenta uma elevada mortalidade, com estimativas

superiores a 50%, mas que podem alcançar de 85 a 100%, o que geralmente está associada a um diagnóstico tardio e tratamento inadequado (13,132–135).

2.1.5 Comorbidade entre a estrogiloidíase e o alcoolismo

O uso de bebidas alcoólicas tem sido parte integral de muitas culturas através dos séculos. Com o passar dos anos e o desenvolvimento tecnológico, novos modelos de produção, distribuição e promoção de bebidas alcoólicas levou a uma mudança no padrão de consumo da população (136). Os danos causados pelo álcool estão entre os cinco maiores fatores de risco para doenças, incapacidade e morte no mundo. Cerca de 5% da carga global de doenças e lesões são atribuídas ao álcool. Na América Latina, o consumo de álcool é superior ao resto do mundo. Em 2012, o álcool levou a aproximadamente um óbito a cada 100 segundos, contribuindo para mais de 300.000 mortes na região (137). A dependência de álcool (também conhecida como alcoolismo ou síndrome de dependência de álcool) é definida como um conjunto de fenômenos comportamentais, cognitivos e fisiológicos que se desenvolvem após o uso repetido de álcool e que, tipicamente, incluem um forte desejo de consumir bebidas alcoólicas e a dificuldade em controlar o uso. O indivíduo persiste neste comportamento mesmo que traga consequências nocivas à sua saúde ou ao convívio em sociedade (136). Não há uma causa definida para o alcoolismo, contudo, vários fatores (socioeconômicos e/ou fisiológicos) podem ter um papel no seu desenvolvimento (138).

Vários estudos demonstraram que o uso crônico de álcool predispõe o indivíduo à infecção por *S. stercoralis* (20). A prevalência da comorbidade é bastante elevada, em torno de 20% (27–30). Nos pacientes com cirrose podem chegar a até 40% (30). Marques e colaboradores evidenciaram que a frequência da infecção por *S. stercoralis* é proporcional à quantidade de álcool ingerida, com uma frequência de 48% em indivíduos que ingerem acima de 450g/dia (28). Um estudo na Costa Rica identificou uma prevalência de *S. stercoralis* 5 vezes maior em pacientes alcoolistas do que na população geral (139), o que corrobora os achados no Brasil e uma metanálise publicada recentemente, que indica um aumento do risco de se adquirir *S. stercoralis* em pacientes alcoolistas (4). Adedayo e colaboradores relataram 27 casos de estrogiloidíase disseminada na ilha caribenha da Dominica e confirmaram que o alcoolismo foi um fator relevante ao mau prognóstico de infecção (140).

O alcoolismo crônico tem sido associado a fatores de risco que favorecem a infecção por *S. stercoralis*, tais como práticas de higiene inadequada, desnutrição, alteração da resposta imune e redução do trânsito intestinal. A diminuição da mobilidade intestinal permite que a larva faça a ecdise da forma rbditoide para a filaróide infectante ainda no interior no hospedeiro, favorecendo a autoinfecção (20). Além disso, o etanol ativa o eixo Hipofise-Pituitaria-Adrenal (HPA), aumentando o nível de cortisol endógeno. A hidrocortisona, ou cortisol, é um hormônio corticosteroide produzido pelo córtex das glândulas adrenais e está

diretamente envolvido na resposta ao estresse. A interação entre o eixo HPA e o sistema imunológico é crucial para a homeostase, a qual em condições de abuso de álcool está rompida. Além do mais, os corticosteróides produzem metabólitos que se assemelham a hidroxiecdisona, um hormônio ecdisteróide que regula a fertilidade das fêmeas partenogenéticas do *S. stercoralis* e induz a transformação de larvas rabditoídes em filarióides infectantes, estimulando a autoinfecção (20,21,134). Essa hipótese é confirmada por um estudo publicado recentemente por nosso laboratório, onde observou-se que níveis elevados de cortisol endógeno em pacientes alcoolistas estão associados ao aumento da carga parasitária (27).

A exposição aguda e/ou crônica ao álcool também pode interferir em vários aspectos da resposta imune adaptativa. A intoxicação aguda diminui a capacidade de apresentação de antígeno, a diferenciação e a função das células dendríticas - traduzidas por níveis reduzidos de CD80 e CD86 nas suas superfícies (essenciais para induzir a ativação de células T) - e a diminuição da produção de IL-12 (aspecto crítico para estimular células T CD4⁺ naïves para desenvolver células Th1) (141). Assim, a ingestão aguda de álcool pode inibir a resposta imune Th1 (141). O contrário é observado durante o uso crônico, uma vez que a maioria dos quadros clínicos decorrentes do uso abusivo de álcool são de origem inflamatória (142–144). No entanto, níveis elevados de IgE já foram observados em alcoolistas (145) e outros estudos, principalmente em animais, apontam para uma preservação da resposta imune Th2 em indivíduos alcoolistas crônicos (146–148). Portanto, estudos adicionais são necessários para se esclarecer os mecanismos de resposta imune em indivíduos que fazem uso crônico de álcool. O agravamento da infecção por *S. stercoralis* em indivíduos alcoolistas traz a necessidade de se priorizar o diagnóstico preciso da parasitose uma vez que o diagnóstico precoce e o tratamento adequado são as formas mais eficazes de se prevenir a estrongiloidíase severa.

2.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da estrongiloidíase é complexo uma vez que a infecção não cursa com características clínicas distintivas e os achados laboratoriais e de imagem geralmente se revelam inespecíficos. Ao longo dos anos, várias técnicas foram desenvolvidas com o objetivo de diagnosticar a infecção por *S. stercoralis*, tais como os métodos parasitológicos, imunológicos e moleculares. Atualmente, o diagnóstico definitivo da infecção por *S. stercoralis* é realizado através da pesquisa das larvas nas fezes (33,149,150). No entanto, a carga parasitária liberada é relativamente baixa e se faz de maneira intermitente, o que torna

necessário o exame de várias amostras em dias alternados (34), dificultando o diagnóstico. Além disso, a sensibilidade dos métodos parasitológicos pode variar de acordo com uma série de outros fatores, tais como a quantidade, a preservação, a manipulação e o processamento adequado das amostras (20,151).

Em busca de um diagnóstico mais sensível, vários métodos parasitológicos foram sendo desenvolvidas e /ou modificados. Entre eles, o Baermann-Moraes (BM) (152) é o mais utilizado na rotina dos laboratórios clínicos, apesar da cultura em placa de ágar (CPA) (153) ser o método mais sensível (33,149). A CPA ainda pode ser utilizada no cultivo das larvas para a produção de antígenos, triagem de novos medicamentos *in vitro* e no estudo da organização do parasito (154). No entanto, mesmo sendo o método mais sensível, a CPA também depende do encontro das larvas nas fezes, o que nem sempre coincide com a realização do exame. Ademais, para a realização deste método, se faz necessário a utilização de fezes frescas e sem conservantes, tornando-o logisticamente mais complicado de usar em contextos clínicos (155). Além do material fecal, Kishimoto e colaboradores (2008) demonstraram que foi possível encontrar larvas de *S. stercoralis* na biopsia duodenal e exames histopatológicos de 71% dos pacientes imunocomprometidos com hiperinfecção (156). No entanto, por se tratar de métodos invasivos, são pouco indicados. Em pacientes com estrogiloidíase disseminada, larvas podem ser encontradas no fluido broncoaveolar (157), liquor (158), urina (159) e biopsia da pele (160).

Diversos métodos para pesquisa de anticorpos séricos vêm sendo testados. Entre eles, a imunofluorescência indireta (IFAT), utilizado na pesquisa de diferentes classes de anticorpos; o ensaio imunoenzimático (ELISA), para detecção de antígeno, anticorpos e imunocomplexos; e o immunoblotting, que é considerado um dos métodos mais sensíveis e específicos no reconhecimento de frações antigênicas por anticorpos circulantes (155,161,162). O ELISA é o método mais utilizado pela sua praticidade, facilidade de realização e disponibilidade de reagentes. Com uma sensibilidade variando entre 73 a 100%, pode ser particularmente útil na exclusão da infecção por *S. stercoralis*, como parte do diagnóstico diferencial (35,37). No entanto, apesar de sua conveniência, o imunodiagnóstico apresentam várias limitações, tais como a presença de reação cruzada com outros helmintos, a incapacidade de distinguir entre infecção atual e passada e a diminuição da sensibilidade em pacientes imunocomprometidos, possivelmente, devido à diminuição da produção de anticorpos (5,54). Além disso, estas técnicas são limitadas pela dificuldade na produção de antígeno homólogo (37,163,164), uma vez que depende do encontro de pacientes hiperinfectados por *S. stercoralis* (26,27,35). Por esse motivo, o uso de antígenos de outras

espécies de *Strongyloides* tem facilitado o diagnóstico imunológico da infecção (17,112,165). No entanto, para a produção destes antígenos heterólogos é necessária a manutenção de animais experimentais infectados, o que restringe sua produção apenas a laboratórios que possuam a infra-estrutura necessária. Para superar as restrições impostas pela dificuldade na produção de antígenos brutos, grupos de pesquisa têm buscado a produção e padronização de antígenos recombinantes e os resultados preliminares mostram uma boa sensibilidade e especificidade (166,167). Atualmente estão disponíveis dois kits comerciais para diagnóstico da infecção por *S. stercoralis* no mercado: Bordier-ELISA, com antígeno de *S. ratti* (Bordier Affinity Products) e IVD-ELISA com antígeno de *S. stercoralis* (IVD Research, Carlsbad, CA, EUA) (54).

Apesar das elevadas sensibilidade e especificidade, poucos estudos avaliam o immunoblotting no imunodiagnóstico da infecção por *S. stercoralis*. Silva et al. (2003) (162) demonstraram que 96% dos soros de pacientes com estrogiloidíase reconheceram antígenos imunodominantes de *Strongyloides ratti*. Sato et al. (1990) (113) revelaram quatro bandas do antígeno com pesos moleculares de 97, 66, 41 e 26 kDa (167). Outras moléculas imunodominantes, variando de 26 a 38 kDa também foram encontradas (167,168). No entanto, nenhum consenso na literatura foi alcançado em relação aos padrões de reconhecimento de moléculas capazes de realizar o diagnóstico.

Novos métodos, como a Imunoprecipitação de luciferase com base em antígenos recombinantes, demonstraram sensibilidades de até 100% e representam uma alternativa promissora (3). Outras opções incluem a reação em cadeia da polímeras (PCR) e os ensaios para detecção de coproantígenos. O PCR para pesquisa de parasitos intestinais, incluindo *Strongyloides stercoralis*, tem sido cada vez mais utilizado, demonstrando elevadas sensibilidade e especificidade (3). No entanto, é limitado pela presença de proteases nas fezes e pelo alto custo (169). O ensaio de amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP) é uma técnica molecular que realiza amplificações altamente específicas e sensíveis e foi utilizado em estudos preliminares para a detecção de *S. stercoralis*, demonstrando bons resultados (170). Este método usa reagentes estáveis, é simples de realizar e não requer uma infraestrutura complexa, além de representar uma técnica nova para o diagnóstico rápido e confiável em áreas com pouco recurso (171). O ELISA para pesquisa de coproantígenos tem sido pouco reportado na literatura (172,173) e envolve a produção de anticorpos monoclonais, que só estão disponíveis em poucos centros de pesquisa. No entanto, uma vez padronizado e validado, pode representar uma alternativa útil para o diagnóstico (54). Dessa forma, se

implementadas de forma eficaz, essas novas tecnologias certamente podem aperfeiçoar o diagnóstico da infecção pelo *S. stercoralis* no futuro (3).

O ELISA para a detecção de outros isotipos de anticorpos, além do IgG, também tem sido utilizado no diagnóstico da estrogiloidíase. No IgE-ELISA há uma diminuição no nível de reações cruzadas, no entanto, a sensibilidade também diminui (174). Além disso, nas coinfeções pelo *S. stercoralis* e HTLV, a pesquisa de IgE específico, na maioria dos pacientes, é negativa. Isso se deve ao fato da infecção pelo HTLV-1 suprimir a produção de IgE (15). O IgA-ELISA pode ser uma opção particularmente útil em pacientes sem excreção de larvas nas fezes (111), uma vez que a imunomodulação da IgA durante as infecções pode levar a resultados parasitológicos negativos (16). Além disso, por se tratar de um anticorpo de mucosa, presente em secreções, o IgA pode ser pesquisado em outras amostras biológicas, tais como saliva e leite materno, que demandam uma coleta menos invasiva (108,111,175).

Apesar dos vários métodos disponíveis, as suas limitações tornam a estrogiloidíase uma helmintíase subdiagnosticada. Uma alternativa em potencial, utilizada por muitos médicos, é o tratamento profilático (164). Esta é uma ferramenta que deve ser utilizada com bastante cautela, uma vez que reações adversas e resistência ao tratamento podem ocorrer e o custo-benefício desta abordagem ainda não foi devidamente avaliado (54,164). No entanto, o tratamento presuntivo é justificado se ferramentas de diagnóstico de alta sensibilidade não estiverem disponíveis ou, mesmo quando disponíveis, em caso de resultados negativos em pacientes imunocomprometidos com suspeita diagnóstica, quando outras causas forem excluídas.

2.1.7 Tratamento

O tratamento das geohelmintíases em áreas endêmicas é desafiador em decorrência do desenvolvimento de resistência e à possibilidade de reinfecção. A estrogiloidíase é uma das parasitoses mais difíceis de se tratar devido a habilidade única de autoinfecção do parasito (38). Além disso, a eficiência do tratamento depende de vários fatores, tais como o sistema imune do hospedeiro, a presença de coinfeção com o HTLV-1 e doenças gastrointestinais (38,82,176). A maioria dos fármacos atua em doses relativamente pequenas e de forma seletiva nas vias biológicas e metabólicas da fêmea partenogenética. No entanto, a eficácia de muitos desses anti-helmínticos em larvas é baixa. Durante muitos anos, os benzimidazóis foram os fármacos de primeira escolha no tratamento da estrogiloidíase. O albendazol tem uma alta capacidade de ligação às beta-tubulinas livres das células parasitárias, inibindo sua polimerização e resultando na perda dos microtúbulos citoplasmáticos e diminuição da

produção de ATP, o que leva a depleção da energia, imobilização e morte do verme adulto (3). O mebendazol inibe a formação dos microtúbulos e a captação de glicose nos vermes adultos. Estes medicamentos afetam a fêmea partenogenética e inviabilizam ovos e larvas (3). No entanto, ambos os fármacos mostram uma grande variabilidade de eficácia, o que limita o seu uso (177–180). O tiabendazol foi muito utilizado, mas a alta incidência de efeitos adversos levou a sua descontinuação no tratamento da estrogiloidíase (177,181).

Atualmente o fármaco de escolha para a infecção por *S. stercoralis* é a ivermectina oral (200 µg/kg/dia, por 2 dias), uma vez que este medicamento atua nas formas adultas e larvar do *Strongyloides* (133,163,180,181). A ivermectina é uma lactona macrocíclica semissintética derivada da avermectina B, substância que ocorre naturalmente a partir da fermentação do *Streptomyces avermitilis*, e liga-se seletivamente a determinados canais iônicos, aumentando a permeabilidade da membrana celular, levando a hiperpolarização, paralisia e morte celular do parasito (3). Métodos alternativos de administração de ivermectina podem ser considerados, especialmente quando os pacientes estão impossibilitados de utilizar a medicação por via oral. Estas incluem as vias retal, subcutânea e intravenosa (134,182–184). As taxas de erradicação com ivermectina, em muitos ensaios clínicos, mostraram resultados notáveis e um nível de cura de até 97%, com um regime terapêutico de 2 dias consecutivos para pacientes assintomáticos (177,178,185). As reações adversas após o tratamento com ivermectina são consideradas raras, leves, transitórias, bem tolerada e não duram mais do que 24 a 48 horas, não exigindo descontinuação da terapia (179,186,187). No entanto, seu uso é limitado em algumas áreas, onde não há liberação para aplicação em seres humanos, tais como Paquistão, Romênia, Taiwan, Israel e Kuwait (18).

A síndrome de hiperinfecção deve ser considerada uma emergência médica potencial. Assim, o tratamento deve ser iniciado imediatamente (5). Se o paciente estiver em uso de imunossupressores, sua redução deve ser considerada. Mas, obviamente, deve-se avaliar o custo-benefício a longo prazo, tendo em vista a condição subjacente. Além disso, o diagnóstico nos membros da família e o uso de medidas profiláticas para prevenir a propagação da infecção devem ser adotadas (188). O acompanhamento do tratamento é essencial, no entanto, é um processo dificultado pela baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos, uma vez que o tratamento parcialmente eficaz pode reduzir o número de larvas nas fezes, mas não erradicar a infecção, necessitando de métodos altamente sensíveis para detectar a falha do tratamento (21,164). Ademais, a reinfeção deve ser levada em consideração nos países endêmicos. Um acompanhamento combinando métodos sorológicos e

parasitológicos, seis a doze meses após o tratamento, é o mais recomendado para avaliar a cura em pacientes infectados com *S. stercoralis* (54).

A existência de dois ciclos evolutivos, da autoinfecção e da rápida evolução para as formas graves tornam o *S. stercoralis* um tema de pesquisa particularmente importante para estudo e investigação, principalmente do diagnóstico e características clínicas, imunológicas e epidemiológicas, especialmente em pacientes que fazem parte dos grupos de risco, como os indivíduos alcoolistas. O consumo crônico de álcool leva a alterações orgânicas em diversos sistemas, deixando o indivíduo mais susceptível a diversas comorbidades. No entanto, existem poucos estudos na literatura que avaliem essa associação na saúde do hospedeiro. Portanto, a realização de trabalhos que avaliem a estrogiloidíase em alcoolistas é de fundamental importância para a saúde pública, de forma que novas estratégias de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle possam ser adotados.

CAPÍTULO 3
AVALIAÇÃO DO IMMUNOBLOTTING PARA DIAGNÓSTICO DA
INFECÇÃO POR *Strongyloides stercoralis*

Avaliação do imunoblotting para diagnóstico da infecção por *Strongyloides stercoralis*

Joelma Nascimento de Souza¹; Márcia Cristina Aquino Teixeira¹; Silmara Marques Allegretti²; Sukwan Handali³; Neci Matos Soares¹

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia

²Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas (UNICAMP)

³Division of Parasitic Diseases and Malaria, Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

RESUMO

Introdução. A infecção por *Strongyloides stercoralis* cursa de forma crônica e assintomática na maioria dos indivíduos. No entanto, em pacientes imunocomprometidos, como por exemplo os alcoolistas, a infecção pode se desenvolver para os quadros graves de hiperinfecção e disseminação. Desta forma, o seu diagnóstico e monitoramento devem ser priorizados. Os métodos parasitológicos, os quais são os mais utilizados, possuem baixas sensibilidades e uma série de outras limitações. O imunodiagnóstico, através do ELISA, é um dos métodos mais utilizados. No entanto, estudos demonstram que o imunoblotting é o método mais sensível e específico, porém ainda não foi definido um padrão de moléculas imunorreativas a serem utilizadas no diagnóstico da estrogiloidíase. Além do mais, todos os métodos de imunodiagnóstico são limitados pela dificuldade na produção de antígenos e pela presença de reações cruzadas. **Objetivo.** Avaliar a imunorreatividade dos anticorpos circulantes IgG e IgA1 em pacientes alcoolistas infectados com *S. stercoralis* à antígenos brutos solúveis de *S. stercoralis* e de *S. venezuelensis*, de membrana de *S. venezuelensis* e aos antígenos recombinantes, NIE e SsIR, através do imunoblotting. **Materiais e Métodos.** Foram selecionados 50 soros de pacientes alcoolistas atendidos no Centro de Acolhimento e Tratamento de Alcoolistas (CATA), sendo 20 monoparasitados com *S. stercoralis*, 15 infectados com outros helmintos intestinais e 15 com três amostras de fezes negativas, avaliadas em dias alternados, por três métodos diferentes. A imunorreatividade aos isotipos de anticorpos IgG e IgA1 foi avaliada com os antígenos solúveis de *S. stercoralis* (SsS) e *S. venezuelensis* (SvS), de membrana de *S. venezuelensis* (SvM) e com os antígenos recombinantes NIE e SsIR. Apenas as bandas com sensibilidade e especificidade superiores a 70% foram consideradas para o diagnóstico. **Resultados.** A imunorreatividade do imunoblotting variou de acordo com o isotipo do anticorpo pesquisado e dos antígenos utilizados. O antígeno de membrana de *S. venezuelensis* demonstrou sensibilidades de 100% (20/20) na pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgA1 e especificidades de 90 (27/30) e 93% (28/30), respectivamente, demonstrando melhor aplicabilidade diagnóstica. Os antígenos SsS e SvS demonstraram sensibilidade e especificidade similares quando marcados tanto com IgG quanto com IgA1, sendo inferiores ao SvM para ambos os anticorpos. Os antígenos recombinantes NIE e SsIR demonstraram baixas especificidades, com elevado número de reações cruzadas para IgG e IgA1, sendo o SsIR o recombinante com maior número, 87% (13/15), para ambos os anticorpos. A reatividade aos anticorpos IgG e IgA1 frente aos diferentes preparados antigênicos demonstrou bandas com um peso molecular variando de 7 a 170 kDa e 14 a 170 kDa, respectivamente. No SsS, a única banda com mais de 70% de ambas sensibilidade e especificidade tanto para o IgG quanto para o IgA1 foi a de 26 kDa. Tanto no SvS quanto no SvM, foi observado um número maior de bandas em comparação ao SsS. As bandas de 26 e 75 kDa do SvM quando marcadas

com IgG apresentaram as mesmas sensibilidades e especificidades de 100 e 90%, respectivamente. Para marcação com IgA1 apresentaram sensibilidades e especificidades de 100 e 95% e 97 e 93% respectivamente. Os dados demonstram que a banda de 26 kDa marcada para o IgA1 demonstrou maior especificidade e a menor diferença entre sensibilidade e especificidade. **Conclusão.** Neste trabalho foi demonstrado que o antígeno de membrana de *S. venezuelensis* apresentou melhor aplicabilidade para o diagnóstico da infecção por *S. stercoralis* através do immunoblotting e que a pesquisa de anticorpos IgA1 apresenta melhor especificidade que a pesquisa de IgG, evidenciando que as moléculas na faixa de 17, 26, 75 e 90 kDa do antígeno de membrana do *S. venezuelensis* podem ser usadas como padrões no diagnóstico da estrogiloidíase, além de serem potenciais candidatas para o desenvolvimento de uma proteína recombinante. Além disso, foi observado que os antígenos recombinantes NIE e SsIR apresentaram uma elevada frequência de reações cruzadas, levantando a necessidade do desenvolvimento de antígenos recombinantes voltados para o diagnóstico da estrogiloidíase em áreas endêmicas.

Palavras chave: *Strongyloides stercoralis*, alcoolistas, diagnóstico, immunoblotting.

Immunoblotting evaluation for *Strongyloides stercoralis* infection diagnosis

Joelma Nascimento de Souza¹; Márcia Cristina Aquino Teixeira¹; Silmara Marques Allegretti²; Sukwan Handali³; Neci Matos Soares¹

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia ²Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas (UNICAMP); ³Division of Parasitic Diseases and Malaria, Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

ABSTRACT

Introduction. The majority of individuals infected with *Strongyloides stercoralis* are asymptomatic. However, in immunocompromised patients, such as alcoholics, the infection can develop in to severe cases of hyperinfection and dissemination, thus the infection diagnosis and monitoring should be priorities. *S. stercoralis* infection diagnosis is mainly performed through parasitological methods, which have low sensitivity and a number of other limitations. Immunodiagnosis is an alternative of high sensitivity and specificity. Although the ELISA for antibody screening is the most used, studies show that immunoblotting is more sensitive and specific, but it does not yet have a defined molecular pattern for diagnosis. Furthermore, all immunodiagnostic methods are limited by the difficulty in producing the homologous antigen and by the presence of cross-reactions. **Aim.** To evaluate the immunoreactivity of circulating antibodies IgG and IgA1 in alcoholic patients infected with *S. stercoralis* to *S. stercoralis* and *S. venezuelensis* crude antigens and NIE and SsIR recombinants antigens through immunoblotting. **Materials and methods.** There were selected 50 sera from alcoholic patients attended at the Centro de Acolhimento e Tratamento de Alcoolistas (CATA), 20 were monoparasitised with *S. stercoralis*, 15 were infected with other intestinal helminths and 15 presented three negative stool samples, evaluated on alternate days, by three different methods. IgG and IgA1 immunoreactivity were evaluated with *S. stercoralis* (SsS) and *S. venezuelensis* (SvS) soluble antigens, *S. venezuelensis* membrane antigen (SvM) and combined NIE and SsIR recombinant antigens. Only bands with sensitivity and specificity greater than 70% were considered for diagnosis. **Results.** The immunoblotting immunoreactivity varied according to the antibody isotype and antigens used. *S. venezuelensis* membrane antigen demonstrated sensitivity of 100% (20/20) in both IgG and IgA1 antibody tests and specificities of 90 (27/30) and 93% (28/30), respectively, demonstrating better diagnostic applicability. SsS and SvS demonstrated similar sensitivity and specificity when tested to IgG and IgA1, being lower than SvM for both antibodies. The recombinant antigens demonstrated low specificities, with a high number of cross-reactions. SsIR was the recombinant with the greatest number of cross-reactions, 86.7% (13/15), for both IgG and IgA1. IgG and IgA1 reactivity to the different antigenic preparations presented bands with a molecular weight ranging from 7 to 170 kDa and 14 to 170 kDa, respectively. In SsS, the only band with more than 70% of both sensitivity and specificity to both IgG and IgA1 was at 26 kDa. In both SvS and SvM, a greater number of bands were observed for IgG and IgA1 compared to SsS. The 26 and 75 kDa SvM bands showed the same sensitivities and specificities of 100 and 90%, respectively, for IgG. For IgA1, they had sensitivity and specificities of 100 and 95% and 97 and 93%, respectively. The data demonstrate that the 26 kDa band for IgA1 demonstrated greater specificity and the smaller difference between sensitivity and specificity. **Conclusion.** In this work, it was demonstrated that *S. venezuelensis* membrane antigen presented better applicability for

S. stercoralis infection diagnosis through immunoblotting and that the IgA1 antibody test has a better specificity than the IgG test, evidencing the 26 and 75 kDa *S. venezuelensis* membrane antigen bands as potential candidates for recombinant protein development. In addition, it was observed that the recombinant antigens NIE and SsIR presented a high cross-reaction frequency, raising the need for recombinant antigens development for strongyloidiasis diagnosis in endemic areas.

Key words: *Strongyloides stercoralis*, alcoholics, diagnosis, immunoblotting.

3.1 INTRODUÇÃO

A infecção por *S. stercoralis* apresenta uma ampla distribuição geográfica mundial, sendo mais frequente em países de clima tropical, principalmente onde há condições de saneamento básico precárias (20). Geralmente, a infecção cursa de forma crônica e assintomática, com uma carga parasitária baixa, o que dificulta o diagnóstico parasitológico (189,190). Mesmo utilizando os métodos mais sensíveis, como a Cultura em Placa de Agar e o Baermann-Moraes, as larvas podem não ser encontradas, uma vez que a liberação das mesmas ocorre de maneira intermitente, sendo necessário a análise de várias amostras de fezes (20,151). Um estudo recentemente publicado por nosso laboratório demonstrou uma correlação positiva entre a carga parasitária, o número de amostras examinadas e a sensibilidade dos métodos para pesquisa de larvas nas fezes (191) (ANEXO C). Durante a infecção, um desequilíbrio da resposta imune do hospedeiro, como acontece no alcoolismo crônico, pode levar ao agravamento da infecção e desenvolvimento dos quadros graves de hiperinfecção e/ou disseminação (21), que apresentam uma elevada taxa de mortalidade, sendo o diagnóstico precoce a principal forma de prevenção (134,192).

Nos últimos anos uma série de métodos sorológicos para o diagnóstico da estrogiloidíase têm sido avaliados (164,193). Entre eles, a imunofluorescência indireta (IFAT), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o imunoblotting (155,161,162). Embora o ELISA para pesquisa de anticorpos seja o método mais utilizado, o imunoblotting tem apresentado maior sensibilidade e especificidade, porém ainda não tem um padrão de moléculas definidas para diagnóstico (113,194–196). A utilização de antígenos brutos tanto homólogos quanto heterólogos é um fator limitante, pela dificuldade de obtenção e reprodução dos ensaios (166,197,198). Os antígenos recombinantes são uma alternativa que independem da presença de indivíduos infectados e permite a produção em grande escala (60). Os recombinantes NIE e SsIR, derivados de larvas L3 do *S. stercoralis*, têm sido avaliados no imunodiagnóstico da estrogiloidíase utilizando ELISA e LIPS em áreas endêmicas, como Argentina e Austrália (60) e ELISA e Luminex em áreas não endêmicas, como os Estados Unidos da América (EUA) (166), demonstrando elevadas sensibilidades e especificidades, acima de 90%. No entanto, ainda carecem de mais estudos em áreas endêmicas com indivíduos imunocomprometidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a imunorreatividade dos anticorpos circulantes IgG e IgA1 de pacientes alcoolistas infectados com *S. stercoralis*

aos antígenos brutos de *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* e aos antígenos recombinantes NIE e SsIR através do immunoblotting.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Casuística

Foram selecionados 50 pacientes alcoolistas crônicos, do sexo masculino, com idade de 24-78 anos, internados durante um período de curta duração (em torno de 20 dias), no Centro de Acolhimento e Tratamento de Alcoolistas (CATA), das Obras Sociais Irmã Dulce (OSID), para desintoxicação alcoólica, no período de 18 de agosto de 2015 a 08 de junho de 2017. Entre os 50 pacientes selecionados, 20 estavam infectados com *Strongyloides stercoralis*, 15 monoparasitados com outros helmintos intestinais (8 com *Schistosoma mansoni* e 7 com ancilostomídeos) e 15 com diagnóstico parasitológico negativos, em três amostras de fezes, analisadas em dias alternados, através de três métodos diferentes. Foram excluídos do estudo os pacientes em uso de glicocorticoides e coinfectados com o vírus HTLV-1.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Enfermagem da Universidade Federal da Bahia sob o número 367.464 (ANEXO D). Os pacientes foram informados da natureza do estudo e, aqueles que concordaram em participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO E).

3.2.2 Produção de antígeno

Larvas de *S. stercoralis*, obtidas a partir de amostras fecais de pacientes hiperinfectados, e larvas de *S. venezuelensis*, recuperadas das fezes de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) (cedidas pelo Departamento de Parasitologia, Universidade de Campinas) foram cultivadas em carvão animal e incubadas em estufa a 27° C durante cinco e três dias, respectivamente, para obtenção das larvas filarioides. Resumidamente, as amostras fecais frescas foram dissolvidas em água destilada e homogeneizadas, em seguida foi adicionado carvão animal granulado numa proporção de fezes e carvão de 1:2. Após a incubação, as larvas filarióides foram recuperadas utilizando o método de Rugai (199), lavadas três vezes com tampão fosfato salina a 0,15M, pH 7,2 (PBS) e centrifugadas a 1.200 x g, por 7 min, a 4° C. As larvas foram ressuspensas em 15 ml de hipoclorito de sódio a 0,25% e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos, após os quais foram quantificadas e lavadas novamente, como na etapa anterior. Seguiu-se a

adição dos seguintes inibidores de proteases: EDTA 5mM, fenil-metilsulfonil-fluoreto 1mM (PMSF, Sigma), TPCK/TLCK 0,05 mM e leupeptina 1 µg/mL. As larvas foram estocadas a -70° C até o momento do uso.

Na etapa final de preparação do antígeno, as larvas foram descongeladas e sonicadas em ultrassom (Branson Sonifier Cell Disruptor), em ciclos de 1 minuto (com descanso de 1 minuto) a 20 kHz, em uma amplitude de 60% (em gelo). A cada 10 ciclos o material foi observado ao microscópio até total disruptura das larvas, sendo necessário um total de 30 ciclos. O material obtido foi centrifugado a 17.500 x g por 30 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi estocado a -70° C (antígeno solúvel) e o sedimento ressuspenso em deoxicolato de sódio 1% (3 mL) e incubado overnight em câmara fria (à 4° C, sob agitação). No dia seguinte, o sedimento foi novamente centrifugado a 17.500 x g por 30 minutos, a 4° C, e o novo sobrenadante (antígeno de membrana) foi coletado e estocado a -70° C, após dosagem do seu conteúdo proteico pelo método de Bradford (200).

Os antígenos recombinantes NIE (167) e SsIR (201), ambos de 26 kDa, foram cedidos pelo Laboratório de Doenças Parasitárias do Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Estados Unidos da América. O NIE foi conjugado a um peptídeo de 29 kD, conferindo um peso molecular final de 55 kDa.

3.2.3 Diagnóstico Parasitológico

Foram realizadas análises de três amostras fecais, em dias alternados, pelos métodos de sedimentação espontânea (202), Baermann-Moraes (152) e Cultura em Placa de Agar (203) em todos os pacientes.

3.2.4 SDS-PAGE e immunoblotting

Inicialmente foi conduzido um estudo piloto com os preparados antigênicos para se estabelecer as concentrações do antígeno e as diluições do conjugado, estreptavidina e soros. Foram utilizados os antígenos solúveis de *S. stercoralis* (SsS) e *S. venezuelensis* (SvS), de membrana de *S. venezuelensis* (SvM) e os recombinantes NIE e SsIR. Resumidamente, aos antígenos brutos, em uma concentração de 50 ng/mL, foram adicionados 2% de Tracking Dye (Bio-Rad Laboratories, USA) e 1% de SDS, seguido de um aquecimento a 65 °C por 15 minutos, após o qual foi adicionado glicerol a 6% até alcançar um volume final de 100 µL. Os antígenos recombinantes NIE e SsIR foram utilizados nas concentrações de 1,6 e 6,3 ng/mL, respectivamente. As amostras foram

adicionadas ao gel pré-fabricado (Criterion™ TGX™ Precast Gel, Bio-Rad Laboratories, USA) e a corrida eletroforética foi realizada em tampão de corrida pré-fabricado (Tris 2,5 mM, glicina 19,2 mM, SDS a 0,01%, pH 8,3, Bio-Rad Laboratories, USA) a 200 V, por 30 min, em temperatura ambiente. Como marcador molecular foi utilizado o Precision Plus Protein™ Dual Color (Bio-Rad Laboratories, USA).

Após a corrida, o gel, a membrana (0,45 µm, Bio-Rad Laboratories, USA) e os papéis filtros umedecidos em tampão de transferência semi-seca (tampão de transferência Tris/CAPS, metanol 15% e SDS 0,01%, Bio-Rad Laboratories, USA) foram montados (dois papéis filtro – membrana – gel – papel filtro) e a transferência foi realizada à 25V, por 1 hora (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories, USA). Em seguida, a membrana foi lavada por 4 vezes, durante 5 minutos, com PBS-tween 0,3% e cortada em tiras de 4 mm. As tiras foram incubadas overnight com os soros diluídos 1:100 em PBS-T 0,3%, leite desnatado 5%, sob agitação constante, à 4 °C. Após lavagem, foram adicionados os conjugados anti-IgG ou anti-IgA1 biotinizados diluídos 1:1000 em PBS-T 0,3%, seguida de incubação por 1h, a temperatura ambiente. Após lavagem, foi adicionada estreptavidina ligada a peroxidase 1:2000, seguida de nova incubação por 1 hora a temperatura ambiente. Após outra lavagem, as membranas foram reveladas em DAB (3,3'-diaminobenzidine) por 10 minutos e lavadas 10 vezes com água deionizada.

3.2.5 Análises estatísticas

A sensibilidade do immunoblotting, para os diferentes antígenos, foi calculada utilizando o resultado dos pacientes alcoolistas infectados com *S. stercoralis*, diagnosticados pelo parasitológico de fezes (n=20). A especificidade foi calculada somando-se os pacientes monoparasitados com *S. mansoni* (n=8) e ancilostomídeos (n=7) com os controles negativos (n=15), totalizando 30 indivíduos. Já a frequência de reações cruzadas foi calculada utilizando os alcoolistas monoparasitados com *S. mansoni* (n=8) e ancilostomídeos (n=7). Apenas as bandas com sensibilidade e especificidade superiores a 70% foram consideradas para o diagnóstico. A sensibilidade e especificidade dos métodos foram comparadas utilizando o teste de Fisher, sendo considerada uma diferença estatisticamente significativa apenas quando o valor de $p < 0,05$.

3.3 RESULTADOS

A imunorreatividade do immunoblotting variou de acordo com o isotipo do anticorpo pesquisado e dos antígenos utilizados. As sensibilidades e especificidades, além das reações cruzadas, estão demonstradas na Tabela 1. As bandas encontradas, bem como suas sensibilidades e especificidades quando marcadas com IgG e IgA1 estão demonstradas na Tabela 2. O antígeno de membrana do *S. venezuelensis* demonstrou sensibilidades de 100% (20/20) na pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgA1 e especificidades de 90 (27/30) e 93% (28/30), respectivamente (Tabela 1), demonstrando melhor aplicabilidade diagnóstica por agregar elevadas sensibilidade e especificidade, menor número de reações cruzadas, além de melhor visibilidade das bandas. Os antígenos solúveis homólogo e heterólogo demonstraram sensibilidade e especificidade similares quando marcados tanto com IgG quanto com IgA1, sendo inferiores ao antígeno de membrana heterólogo para ambos os anticorpos (Tabela 1). Os antígenos recombinantes demonstraram baixas especificidades, com elevado número de reações cruzadas para IgG e IgA1, sendo o SsiR o recombinante com maior número de reações cruzadas, 87% (13/15) para ambos os anticorpos (Tabela 1 e 2).

Tabela 1. Sensibilidade e especificidade do immunoblotting utilizando diferentes preparados antigênicos.

Antígeno	IgG			IgA1		
	Sensibilidade % (n)	Especificidade % (n)	Reações Cruzadas % (n)	Sensibilidade % (n)	Especificidade % (n)	Reações Cruzadas % (n)
SsS	75 (15/20)	87 (26/30)	13 (2/15)	85 (17/20)	90 (27/30)	20 (3/15)
SvS	75 (15/20)	87 (26/30)	20 (3/15)	85 (17/20)	93 (28/30)	13 (2/15)
SvM	100 (20/20)	90 (27/30)	7 (1/15)	100 (20/20)	93 (28/30)	13 (2/15)
NIE	95 (19/20)	67 (20/30)*	60 (9/15)	65 (13/20)	63 (19/30)*	53 (7/15)
SSiR	85 (17/20)	33 (10/30)*	87 (13/15)	100 (20/20)	33 (10/30)*	87 (13/15)

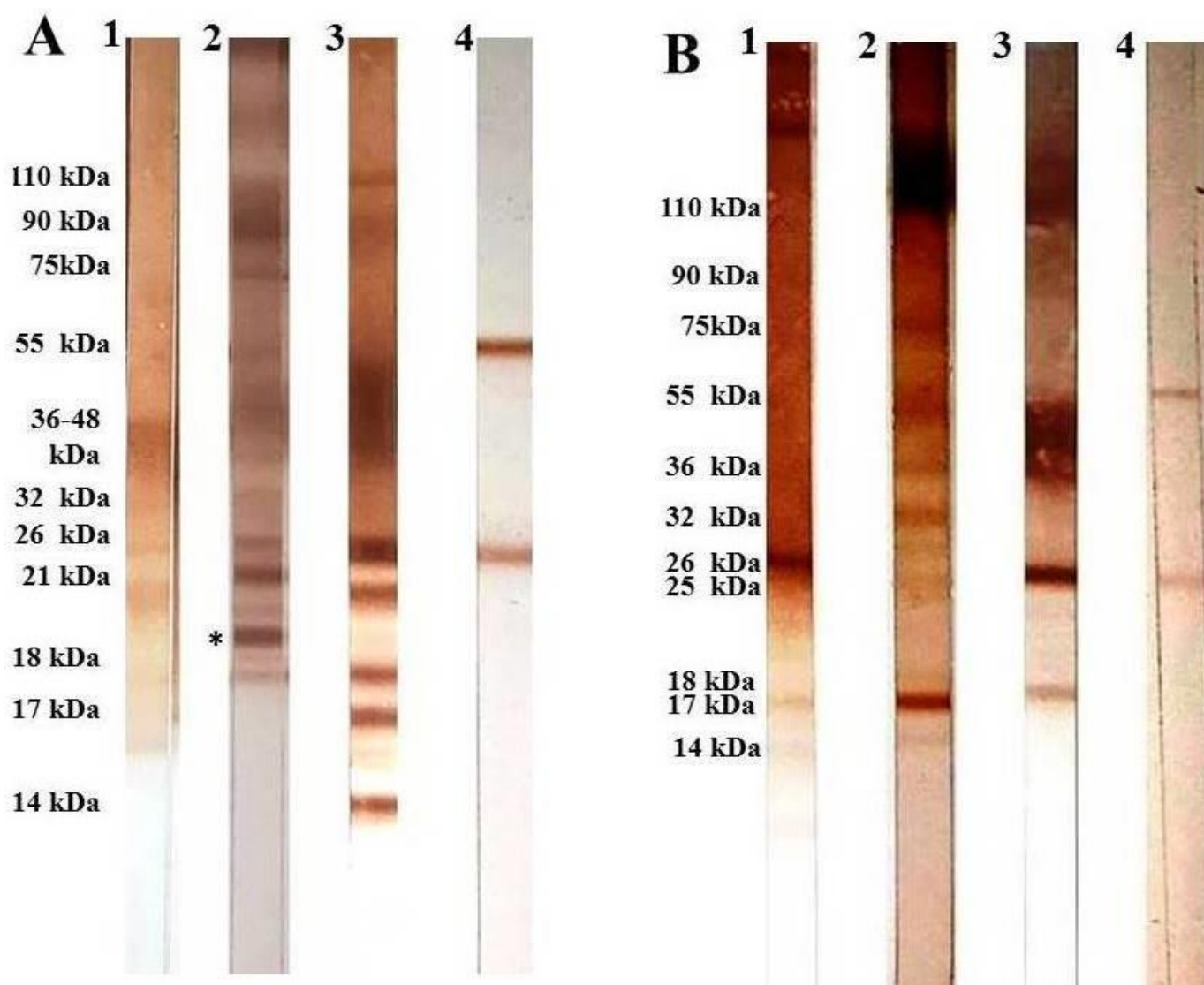
SsS - Solúvel de *S. stercoralis*; SvS - Solúvel de *S. venezuelensis*; SvM - Membranar de *S. venezuelensis*; NIE e SSiR- recombinantes

*p<0,05 em relação ao SvM

A reatividade dos anticorpos IgG e IgA1 aos diferentes preparados antigênicos demonstrou bandas com um peso molecular variando de 7 a 170 kDa e 14 a 170 kDa, respectivamente (Figura 1). O antígeno bruto solúvel de *S. stercoralis* (SsS) apresentou um total de 9 e 3 bandas quando marcado com os anticorpos IgG e IgA1, respectivamente. A única banda com mais de 70% de ambas sensibilidade e especificidade tanto para o IgG quanto para o IgA1 foi a de 26 kDa (Tabela 2). Tanto no

antígeno bruto solúvel de *S. venezuelensis* (SvS) quanto no antígeno solúvel de membrana de *S. venezuelensis* (SvM), foi observado um número maior de bandas com marcação para ambos o IgG e o IgA1 quando comparados com o SsS. Três bandas para o SvS, de pesos moleculares de 75, 26 e 14 kDa, e 4 bandas para o SvM, de pesos moleculares de 90, 75, 26, e 22 kDa apresentaram ambas sensibilidades e especificidades superiores a 70% quando os antígenos foram marcados com IgG. Para a marcação com IgA1 foi demonstrado nos antígenos SvS e SvM que as bandas de 55, 32 e 17 kDa e 90, 75 e 26 e 17 kDa apresentaram ambas sensibilidade e especificidade acima de 70%, respectivamente. As bandas de 26 e 75 kDa do SvM, marcadas com IgG, apresentaram as mesmas sensibilidades e especificidades, 100 e 90%, respectivamente. Para marcação com IgA1, apresentaram sensibilidades e especificidades de 100 e 95% e 97 e 93%, respectivamente. A banda de 26 kDa marcada para o IgA1 demonstrou maior especificidade e a menor diferença entre sensibilidade e especificidade (Tabela 2).

Figura 1. Immunoblotting utilizando antígenos solúveis de *S. stercoralis* (1) de *S. venezuelensis* (2), de membrana de *S. venezuelensis* (3) e os antígenos recombinantes NIE-SsIR (4) marcados com IgG (A) e IgA1 (B).



* banda de 17 kDa

Tabela 2. Sensibilidade e especificidade do imunoblotting dos antígenos brutos solúveis de *S. stercoralis* (SsS) e *S. venezuelensis* (SvS), do antígeno de membrana de *S. venezuelensis* (SvM) e dos antígenos recombinantes IE-SsIR de acordo com a reatividade aos anticorpos IgG e IgA1.

Anticorpo	Peso Molecular (kDa)	SsS (%)		SvS (%)		SvM (%)		NIE-SsIR (%)	
		Se	Esp	Se	Esp	Se	Esp	Se	Esp
IgG	170	-	-	100	23	100	63	-	-
	105	-	-	100	37	15	100	-	-
	90	-	-	100	37	<u>70</u>	<u>90</u>	-	-
	75	20	100	<u>70</u>	<u>93</u>	<u>100</u>	<u>90</u>	-	-
	55	50	100	45	97	35	100	<u>85</u>	<u>33</u>
	50	20	93	20	97	-	-	-	-
	45	10	93	100	67	-	-	-	-
	36	40	80	20	100	100	43	-	-
	32	-	-	35	97	-	-	-	-
	26	<u>75</u>	<u>87</u>	45	97	<u>100</u>	<u>90</u>	<u>95</u>	<u>67</u>
	25	-	-	<u>75</u>	<u>90</u>	-	-	-	-
	22	45	87	25	100	<u>85</u>	<u>93</u>	-	-
	17	-	-	35	100	65	93	-	-
	14	65	93	<u>70</u>	<u>87</u>	60	93	-	-
7	10	93	-	-	65	100	-	-	
IgA1	170	-	-	100	27	-	-	-	-
	90	-	-	100	50	<u>95</u>	<u>97</u>	-	-
	75	-	-	40	93	<u>95</u>	<u>93</u>	-	-
	55	-	-	<u>80</u>	<u>93</u>	50	100	<u>100</u>	<u>33</u>
	50	-	-	-	-	50	100	-	-
	45	-	-	60	83	70	80	-	-
	36	-	-	55	100	-	-	-	-
	32	-	-	<u>70</u>	<u>100</u>	-	-	-	-
	26	<u>85</u>	<u>90</u>	55	100	<u>100</u>	<u>97</u>	<u>65</u>	<u>63</u>
	25	-	-	55	100	-	-	-	-
	21	-	-	55	100	-	-	-	-
	18	-	-	55	100	-	-	-	-
	17	50	100	<u>85</u>	<u>93</u>	<u>85</u>	<u>100</u>	-	-
14	50	100	55	100	-	-	-	-	

As bandas sublinhadas e em negrito foram escolhidas para o diagnóstico da infecção por *S. stercoralis* através do imunoblotting

Se Sensibilidade; Esp Especificidade

*NIE 26kDa; SsIR 55kDa

3.4 DISCUSSÃO

Indivíduos infectados com *S. stercoralis* respondem a estímulos específicos com produção de isotipos de anticorpos das classes IgG, IgE, IgM e IgA (16,17,107–109). Diversos estudos utilizam a pesquisa destes anticorpos aplicados ao diagnóstico da

estrongiloidíase através do ELISA (17,108,109,112), embora o immunoblotting possua sensibilidade e especificidades superiores, por identificar frações proteicas específicas. Porém, o seu uso é ainda limitado, possivelmente, por não existir um padrão de moléculas definidas aplicadas ao diagnóstico da infecção por *S. stercoralis* (113,162,167,194–196,204). Além disso, o imunodiagnóstico é limitado pela dificuldade na produção de antígenos brutos, pela presença de reações cruzadas com outros helmintos e pela baixa reprodutibilidade dos ensaios. Nos últimos anos, a utilização de antígenos recombinantes tem conferido maior precisão e reprodutibilidade aos ensaios, além da possibilidade de produção em larga escala (60,166,167,198). O imunodiagnóstico da estrongiloidíase geralmente é realizado pela detecção de IgG específico, provavelmente, por ser o anticorpo circulante mais abundante (35,134,192). A pesquisa de IgA também tem sido utilizada, uma vez que as fêmeas partenogênicas, imersas na submucosa intestinal, estimulam a produção desta classe de anticorpos (108,111,112,175).

Este estudo demonstra que a marcação dos antígenos brutos homólogos e heterólogos com IgG e IgA1 revelaram bandas de 7 a 170 kDa e 14 a 170 kDa, respectivamente. Resultados similares foram descritos por Corral e colaboradores (2017), ao observar 11 bandas, variando de 15 a 150 kDa, em preparados antigênicos de *S. venezuelensis* (194). Destaca-se em nosso estudo as bandas imunorreativas de 26 e 75 kDa, do antígeno SvM, marcadas tanto com IgG como com IgA1, que pelas suas elevadas sensibilidades e especificidades podem ser utilizadas como padrões no imunodiagnóstico da estrongiloidíase, sendo potenciais candidatas no desenvolvimento de antígenos recombinantes. Também foi observado que a marcação com IgA1 elevou significativamente a sensibilidade das bandas 17 e 90 kDa ($p < 0,05$). Corral et al (2017, 2018) também demonstraram que o antígeno de membrana de *S. venezuelensis* é mais sensível e específico para o diagnóstico da estrongiloidíase, porém as principais bandas identificadas foram diferentes das observadas neste estudo (194,205). Provavelmente, devido ao grupo de paciente ser constituído de alcoolistas, como também às diferenças na preparação dos antígenos. Os antígenos associados à membrana dos nematódeos são os primeiros a serem expostos ao sistema imunológico do hospedeiro e podem representar bons alvos para o imunodiagnóstico, porém ainda são pouco estudados (206).

A maioria das bandas identificadas no SvM também foram observadas no SvS tanto na marcação com IgG quanto na marcação com IgA1, porém com menor frequências. A principal banda para diagnóstico no antígeno solúvel de *S. stercoralis* apresentou um peso molecular de 26 kDa, tendo maior sensibilidade e especificidade quando marcada com IgA1.

Sato et al. (1990) (113), Sudré et al. (2007) (168) e Rodpai et al. (2016) (207) também identificaram uma banda de 26 kDa, no antígeno de *S. stercoralis* marcado com IgG, com uma frequência similar à encontrada em nosso estudo.

Os antígenos recombinantes NIE e SsIR vem sendo empregados no diagnóstico da infecção por *S. stercoralis* para a pesquisa de anticorpos IgG e IgG4, através do ELISA, do Sistema de Imunoprecipitação pela Luciferase (LIPS) e do Luminex, com sensibilidades e especificidades variando de 87 a 100% e 90 a 100%, respectivamente, (60,166,193,201,208–210). Neste trabalho, apesar de apresentar uma elevada sensibilidade, os antígenos recombinantes apresentaram uma especificidade inferior, em torno de duas vezes, aos antígenos brutos, além de elevada frequência de reações cruzadas, o que pode ser explicado pela população estudada, uma vez que se trata de pacientes alcoolistas de área endêmica.

Neste trabalho foi demonstrado que o antígeno de membrana de *S. venezuelensis* apresentou melhor aplicabilidade para o diagnóstico da infecção por *S. stercoralis* através do immunoblotting e que a pesquisa de anticorpos IgA1 apresenta melhor especificidade que a pesquisa de IgG, evidenciando que as moléculas na faixa de 17, 26, 75 e 90 kDa do antígeno de membrana do *S. venezuelensis* podem ser usadas como padrões no diagnóstico da estrogiloidíase, além de serem potenciais candidatas para desenvolvimento de uma proteína recombinante. Além disso, foi observada uma baixa especificidade e uma elevada frequência de reações cruzadas dos antígenos recombinantes NIE e SsIR, levantando a necessidade do desenvolvimento de antígenos recombinantes voltados para o diagnóstico da estrogiloidíase em grupos de risco de áreas endêmicas.

CAPÍTULO 4

DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE EM PACIENTES ALCOOLISTAS BASEADO NA IMUNORREATIVIDADE A DIFERENTES ISOTIPOS DE ANTICORPOS

DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE EM PACIENTES ALCOOLISTAS BASEADO NA IMUNORREATIVIDADE A DIFERENTES ISOTIPOS DE ANTICORPOS

Joelma Nascimento de Souza¹; Alana das Virgens Cruz¹; Maria Del Carmen Moleiro Alves²; Márcia Cristina Aquino Teixeira¹; Sukwan Handali³; Neci Matos Soares¹

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brazil

²Centro de Acolhimento e Tratamento de Alcoolistas (CATA), Obras Sociais Irmã Dulce (OSID), Salvador, Brazil,

³Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA

RESUMO

Introdução. A estrogiloidíase é uma parasitose emergente que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos. O diagnóstico da infecção atualmente é realizado através do exame parasitológico de fezes, os quais apresentam baixas sensibilidades. O diagnóstico imunológico vem sendo utilizado para triagem da infecção, entretanto a presença de resultados falsos positivos e a dificuldade na produção do antígeno homólogo dificultam o seu uso. **Objetivo.** Avaliar a imunorreatividade a diferentes classes e sub-classes de anticorpos anti-*S. stercoralis* circulantes em pacientes alcoolistas através do ELISA e realizar o immunoblotting em pacientes com resultados parasitológico e ELISA discordantes. **Materiais e métodos.** Foram incluídos no estudo 345 indivíduos com diagnóstico clínico de alcoolismo crônico internados no Centro de Acolhimento e Tratamento de Alcoolistas (CATA), Salvador, Bahia, Brasil. Todos os pacientes realizaram exames parasitológicos de fezes (sedimentação espontânea, Baermann-Moraes e Cultura em Placa de Agar) e o imunodiagnóstico da estrogiloidíase através do ELISA para pesquisa de anticorpos das classes IgG, IgE e IgA1. O IgG1 e IgG4-ELISA só foram realizados nos pacientes com eliminação de larvas nas fezes. Nos indivíduos com resultado parasitológico positivo e ELISA negativo para uma ou mais classes e/ou subclasses de anticorpos foi realizado o immunoblotting utilizando o antígeno de membrana de *Strongyloides venezuelensis* marcado com IgA1, sendo consideradas positivos as amostras que apresentaram bandas de 90, 75, 26 e/ou 17 kDa. **Resultados.** As sensibilidades e especificidades dos ELISAs variaram a depender dos diferentes isotipos de anticorpos utilizados. As maiores sensibilidades e especificidades foram encontradas no IgG4-ELISA, com 96 e 93%, seguida do IgE-ELISA, com 94 e 92%, respectivamente. No entanto a imunorreatividade ao IgE com os soros de pacientes alcoolistas, com presença de larvas nas fezes, foi de apenas 70% (52/74), demonstrando que a pesquisa de IgE específica é um método de baixa sensibilidade para o diagnóstico da estrogiloidíase nestes pacientes. Um resultado similar foi encontrado no IgG1-ELISA, onde apenas 57% (42/74) dos alcoolistas com eliminação de larvas nas fezes foi positivo. Além do mais, a média das densidades ópticas do IgG1 específico em soros de pacientes alcoolistas infectados foi menor comparada com a dos pacientes não alcoolistas infectados ($p < 0,05$) e uma correlação negativa significativa ($r = -0,273$, $p < 0,05$) entre os níveis de IgG1 anti-*S. stercoralis* e a carga parasitária foi observada. O IgA1 e o IgG4-ELISA demonstraram maior capacidade de detecção dos anticorpos específicos nos pacientes alcoolistas com resultado parasitológico positivo, 80

(59/74) e 85% (63/74), respectivamente. Os soros dos pacientes alcoolistas com presença de larvas nas fezes, e ausência de detecção de anticorpos anti-*S. stercoralis* através dos ELISAs apresentaram imunorreatividade ao antígeno de membrana de *S. venezuelensis* para o anticorpo IgA1 em 92% (33/36) dos pacientes, confirmando a presença de anticorpos específicos circulantes. **Conclusão.** O IgG4 e o IgE-ELISA apresentaram as sensibilidades e especificidades mais elevadas para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase, no entanto para o diagnóstico de pacientes alcoolistas, foi observada uma baixa imunorreatividade do IgE e IgG1-ELISA. Provavelmente, uma imunomodulação na produção destes anticorpos, induzida pelo álcool, levou a uma diferença na imunorreatividade entre os pacientes alcoolistas e não alcoolistas infectados com *S. stercoralis*. Através do immunoblotting, pode-se confirmar a infecção pelo *S. stercoralis* em 92% dos pacientes com eliminação de larvas nas fezes e ELISA negativo para uma ou mais classes de anticorpos. Este trabalho abre um precedente para estudos futuros no uso de diferentes classes e subclasses de anticorpos para diagnóstico e avaliação da resposta imune da infecção por *S. stercoralis*.

Palavras-chave: *S. stercoralis*, alcoolistas, anticorpos, imunorreatividade, imunodiagnóstico.

DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE EM PACIENTES ALCOOLISTAS BASEADO NA IMUNORREATIVIDADE A DIFERENTES ISOTIPOS DE ANTICORPOS

Joelma Nascimento de Souza¹; Alana das Virgens Cruz¹; Maria Del Carmen Moleiro Alves²; Márcia Cristina Aquino Teixeira¹; Sukwan Handali³; Neci Matos Soares¹

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brazil

²Centro de Acolhimento e Tratamento de Alcoolistas (CATA), Obras Sociais Irmã Dulce (OSID), Salvador, Brazil; ³Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA

Introduction. Strongyloidiasis is an emerging parasitosis that mainly affects immunocompromised individuals. The infection diagnosis is currently performed by feces parasitological examination, which has low sensitivity. The immunological diagnosis has been used in the infection screen; however, the presence of false positive results and the difficulties in producing the homologous antigen limits its use. **Aim.** To evaluate anti-*S. stercoralis* circulating antibodies immunoreactivity in alcoholic patients by ELISA and to perform immunoblotting in patients with discordant parasitological and ELISA results. **Materials and methods.** The study included 345 individuals diagnosed with chronic alcoholism hospitalized at the Centro de Acolhimento e Tratamento de Alcoolistas (CATA), Salvador, Bahia, Brazil. All patients went through parasitological fecal examination (spontaneous sedimentation, Baermann-Moraes and Agar Plate Culture) and IgG, IgE and IgA1-ELISA. IgG1 and IgG4-ELISA were made only in patients with larvae excretion in feces. Immunoblotting using *Strongyloides venezuelensis* membrane antigen for IgA1 detection was performed to evaluate the serum samples with discordant results between the parasitological and immunological methods. There were considered positive the serum samples that presented reactivity at 90, 75, 26 and/or 17 kDa. **Results.** The ELISAs sensitivity and specificities varied depending on the different antibodies isotypes. The highest sensitivity and specificities were found in IgG4-ELISA, with 96 and 93%, followed by IgE-ELISA, with 94 and 92%, respectively. However, IgE immunoreactivity in alcoholic patients sera with larvae in the feces was only 70% (52/74), indicating that IgE-ELISA is a low sensitivity method for strongyloidiasis diagnosis in these patients. A similar result was observed in the IgG1-ELISA, were only 57% (42/74) of the patients with larvae excretion were positive. Besides, the mean optical density of specific IgG1 in sera from infected alcoholic patients was lower than in non-alcoholic infected patients ($p < 0.05$) and a significant negative correlation ($r = -0.273$, $p < 0.05$) was observed between anti-*S. stercoralis* IgG1 level and the parasite load. IgA1 and IgG4-ELISA were the best option to detect specific antibodies in alcoholic patients with faecal larvae excretion, 80 (59/74) and 85% (63/74), respectively. About 92% (33/36) of the sera from alcoholic patients with larvae in the feces and ELISA for *S. stercoralis* antibodies detection negative showed immunoreactivity to *S. venezuelensis* membrane antigen for IgA1, confirming the presence of specific circulating antibodies. **Conclusion.** IgG4 and IgE-ELISA showed the highest sensitivity and specificity for strongyloidiasis immunodiagnosis, however a low IgE and IgG1-ELISA immunoreactivity was observed in alcoholic patients. Probably, an alcohol-induced immunomodulation in the antibody production led to this result. Immunoblotting could confirm *S. stercoralis* infection in 92% of patients with faecal larvae elimination and negative ELISA for one or more antibodies classes or subclasses. This work sets a precedent for future studies in the use of different antibodies classes and subclasses for *S. stercoralis* diagnosis and immune response evaluation.

Key words: *S. stercoralis*, alcoholics, antibodies, ELISA, immunoblotting.

4.1 INTRODUÇÃO

As principais comorbidades relacionadas à estrogiloidíase grave são a coinfeção com o HTLV-1, o uso crônico de corticoides e o alcoolismo. Neste último, a prevalência da infecção por *S. stercoralis* varia em torno de 20%, sendo até 5 vezes superior a população geral (27–29). O uso crônico do álcool altera o funcionamento do eixo hipotálamo – pituitária – adrenal (HPA), elevando os níveis de corticosteroides endógenos e, conseqüentemente, os seus metabólitos. Estes atuam estimulando o ciclo de autoinfecção, mimetizando o efeito do hormônio parasitário ecdisona, responsável pela transformação das larvas rãbitóides em filarióides infectantes, favorecendo a cronificação da doença (22). Um estudo recente do nosso grupo demonstrou que o aumento do nível de cortisol endógeno está diretamente relacionado ao aumento do número de larvas excretados nas fezes (27). Além do mais, o consumo crônico de álcool também possui um efeito tóxico sobre as proteínas contráteis do músculo liso do intestino delgado e sobre a função vagal, reduzindo o trânsito gastrointestinal e levando a permanência das larvas rãbitóides no lúmen por um período mais prolongado, potencializando o ciclo de autoinfecção (212,213).

O diagnóstico parasitológico da infecção por *S. stercoralis* depende da detecção de larvas em amostras de fezes. No entanto, a excreção das larvas ocorre de maneira intermitente, levantando a necessidade da análise de várias amostras (26,27,33). Os métodos sorológicos são ferramentas que auxiliam no diagnóstico da estrogiloidíase (35,36), embora seu uso seja limitado pela presença de reações cruzadas com outros parasitos e a dificuldade da produção de antígeno homólogo (35,37). O uso de antígenos heterólogos, tais como *S. ratti* e *S. venezuelensis*, tem facilitado o imunodiagnóstico (17,112,162,195,214–216), embora as sensibilidades e especificidades ainda não tenham alcançado valores desejáveis, pela utilização destes antígenos não purificados. Além disso, são necessários animais experimentais infectados, o que limita o seu uso a laboratórios com a infra-estrutura requerida.

A infecção por *S. stercoralis* induz uma rápida produção de IgE, IgG1, IgG2 e IgG3, seguida do aumento dos níveis de IgG4 semanas após a infecção (16,217). Apesar disso, poucos estudos avaliaram a imunorreatividade destes diferentes isotipos e subtipos de anticorpos no diagnóstico da estrogiloidíase. Entre os métodos disponíveis para o imunodiagnóstico, o mais utilizado é o IgG-ELISA, *in house*, utilizando antígenos totais e/ou fracionados. No entanto, o immunoblotting pode ser uma ferramenta extremamente útil, pois permite o reconhecimento de moléculas específicas, o que torna o ensaio mais sensível e

específico (195). O objetivo deste trabalho é avaliar a imunorreatividade de diferentes classes e subclasses de anticorpos anti-*S. stercoralis* circulantes para imunodiagnóstico da estrogiloidíase e confirmar a infecção através do reconhecimento de moléculas específicas pelo immunoblotting nos resultados discordantes entre os métodos parasitológicos e imunológicos.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Casuística

Foram incluídos no estudo 345 pacientes do sexo masculino com idade entre 24 e 78 anos com diagnóstico clínico de alcoolismo crônico, internados por um período de curta duração (em torno de 20 dias) no Centro de Acolhimento e Tratamento de Alcoolistas (CATA), das Obras Sociais Irmã Dulce (OSID), para desintoxicação alcoólica, de agosto de 2015 a junho de 2017. Todos os pacientes realizaram exames parasitológicos de fezes (sedimentação espontânea, Baermann-Moraes e Cultura em Placa de Agar), com resultados de três amostras de fezes ou apenas um resultado positivo para *S. stercoralis*. O número de larvas nas fezes foi quantificado através do método de Baermann-Moraes modificado, onde se mensurou a quantidade de larvas em um grama de fezes. Como grupo comparação, foram selecionados 100 indivíduos não alcoolistas atendidos no Laboratório de Análises Clínicas e Tóxicológicas da Faculdade de Farmácia (LACTFAR), UFBA, sendo 50 infectados com *S. stercoralis*; 20 monoparasitados com outros parasitos intestinais e 30 adultos aparentemente saudáveis, com exame parasitológico negativo. Foram excluídos do estudo os indivíduos em uso de glicocorticoides e coinfectados com o vírus HTLV-1.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Enfermagem da Universidade Federal da Bahia sob o número 367.464 (ANEXO D). Os pacientes foram informados da natureza do estudo e, aqueles que concordaram em participar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO E).

4.2.2 Produção de antígeno

Larvas de *S. stercoralis*, obtidas a partir de amostras fecais de pacientes hiperinfectados, e larvas de *S. venezuelensis*, recuperadas das fezes de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) (cedidas pelo Departamento de Parasitologia, Universidade de Campinas) foram cultivadas em carvão animal e incubadas em estufa a 27° C durante cinco e três dias, respectivamente, para obtenção das larvas filarioides. Resumidamente, as amostras fecais frescas foram dissolvidas em água destilada e homogeneizadas, em seguida foi adicionado

carvão animal granulado numa proporção de fezes e carvão de 1:2. As larvas filarióides foram recuperadas do carvão, utilizando o método de Rugai (199), lavadas três vezes com tampão fosfato salina a 0,15M, pH 7,2 (PBS) e centrifugadas a 1.200 x g, por 7 min, a 4° C. Apenas para as larvas de *S. stercoralis*, o sedimento contendo as larvas foi ressuspensão em 15 ml de hipoclorito de sódio a 0,25%, incubado a temperatura ambiente por 5 minutos e lavado como na etapa anterior. Seguiu-se a adição dos seguintes inibidores de proteases: EDTA 5mM, fenil-metilsulfonil-fluoreto 1mM (PMSF, Sigma), TPCK/TLCK 0,05 mM e leupeptina 1 µg/mL. As larvas foram estocadas a -70° C até o momento do uso.

Na etapa final de preparação do antígeno, as larvas foram descongeladas e sonicadas em ultrassom (Branson Sonifier Cell Disruptor), em ciclos de 1 minuto (com descanso de 1 minuto) a 20 kHz, em uma amplitude de 60% (em gelo). A cada 10 ciclos o material foi observado ao microscópio até total disruptura das larvas, sendo necessário um total de 30 ciclos. O material obtido foi centrifugado a 17.500 x g por 30 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi estocado a -70° C (antígeno solúvel) e o sedimento ressuspensão em deoxicolato de sódio 1% (3 mL) e incubado overnight em câmara fria (à 4° C, sob agitação). No dia seguinte, o sedimento foi novamente centrifugado a 17.500 x g por 30 minutos, a 4° C, e o novo sobrenadante (antígeno de membrana) foi coletado e estocado a -70° C, após dosagem do seu conteúdo proteico pelo método de Bradford (200).

4.2.3 ELISA para detecção de anticorpos específicos

A cada poço das placas de microtitulação (placas de 96 poços, Corning Inc. Coostar polystyrene EIA/RIA plates) foram adicionados 100 µL do antígeno de *S. stercoralis* ou *S. venezuelensis* diluído em tampão carbonato bicarbonato a 0,06 M, pH 9,6 nas concentrações de 3, 5, 5, 10 e 20 µg/mL para o IgA1, IgG, IgG1, IgE e IgG4-ELISA, respectivamente. Em seguida, as placas foram incubadas overnight a 4° C e lavadas cinco vezes com PBS (tampão fosfato salina) a 0,15M, Tween 20 a 0,05%, pH 7,2. A cada poço adicionou-se 100 µL de PBS a 0,15 M, pH 7,2 contendo 16% p/v de leite desnatado (tampão de bloqueio) e as placas foram incubadas durante 1 hora, a 37° C, seguido de lavagem como na etapa anterior. Um volume de 100 µL de cada amostra de soro diluída em tampão de bloqueio (1:100 para IgG e IgA1, 1:4 para IgG1 e IgG4 e 1:2 para IgE) foi aplicado aos poços e as placas foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente. Após lavagem, foram adicionados 100 µL do conjugado específico para cada ELISA diluído em tampão de bloqueio a 1:2000 para todos os isotipos, exceto o anti-IgA1 e anti-IgE (1:1000). As placas foram incubadas a 37° C em câmara úmida. Apenas para o IgE-ELISA foi utilizado o conjugado anti-IgE humano biotilado (Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO, USA) e, neste caso, após adição do conjugado a reação foi amplificada com 100 µl/poço de estreptavidina (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluída 1:500 em tampão de bloqueio com incubação de 30 minutos. Após a lavagem, a reação foi revelada com a adição de 100 µL do substrato (100 µL de tampão citrato-fosfato a 0,051 M, pH 5,0 contendo o-fenilenodiamina a 0,0037 M e água oxigenada 30 volumes a 0,04%), seguida de incubação ao abrigo da luz durante 20 minutos. A reação foi interrompida com 20 µL de ácido sulfúrico a 8 N e a leitura das densidades ópticas realizadas em espectrofotômetro, utilizando o filtro de 450-630nm (Awareness Technology Inc., USA) e 405-450 nm (apenas para o IgE-ELISA). O ponto de corte, a sensibilidade e a especificidade para os ensaios foram estabelecidos através da curva ROC (Receiver operating characteristic), sendo a sensibilidade calculada com base no resultado dos indivíduos não alcoolistas monoparasitados com *S. stercoralis* e a especificidade calculada com base nos indivíduos monoparasitados com outros helmintos intestinais (*Schistosoma mansoni*, *Ascaris lumbricoides* e ancilostomídeos) e negativos para qualquer parasitose intestinal.

4.2.4 SDS-PAGE e immunoblotting

Resumidamente, ao antígeno bruto de membrana de *Strongyloides venezuelensis*, em uma concentração de 50 ng/mL, foram adicionados 2% de Tracking Dye (Bio-Rad Laboratories, USA) e 1% de SDS, seguido de um aquecimento a 65°C por 15 minutos, após o qual se adicionou glicerol 6% até completar um volume final de 100 µL. Este material foi adicionado ao gel pré-fabricado (Criterion™ TGX™ Precast Gel, Bio-Rad Laboratories, USA) e a corrida eletroforética realizada em tampão de corrida 1x (tampão de corrida pré-misturado 10x, contendo Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS a 0,1%, pH 8,3, diluído para 1x com água destilada antes do uso, Bio-Rad Laboratories, USA) a 200 V por 30 min, em temperatura ambiente. Como marcador molecular foi utilizado o Precision Plus Protein™ Dual Color (Bio-Rad Laboratories, USA). Após a corrida, o gel, a membrana (0,45 µm, Bio-Rad Laboratories, USA) e os papéis filtros umedecidos em tampão de transferência (tampão de transferência pré-misturado 10x para transferência semi-seca, contendo Tris/CAPS, metanol 15% e SDS 0,1%, Bio-Rad Laboratories, USA) foram montados (dois papéis filtro – membrana – gel – papel filtro) e a transferência foi realizada (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories, USA) à 25V por 1 hora. Em seguida, a membrana foi lavada por 4 vezes, durante 5 minutos, com PBS-tween 0,3% e cortada em tiras de 4 mm. As tiras foram incubadas overnight com os soros diluídos 1:100 em PBS-T 0,3%, leite desnatado

5%, à 4 °C sob agitação constante. Após lavagem, foi adicionado o conjugado anti-IgA1 diluído 1:1000 em PBS-T 0,3%, seguida de incubação por 1h a temperatura ambiente. Após lavagem, foi adicionada estreptavidina ligada a peroxidase 1:2000, seguida de nova incubação por 1 hora. Após outra lavagem, as membranas foram reveladas em DAB (3,3'-diaminobenzidine) por 10 minutos e lavadas 10 vezes com água deionizada.

4.2.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares Statistical Package for Social Science (version 19.0 para Windows; SPSS) e o programa Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, Califórnia, EUA). Para testar a suposição de normalidade dos dados foram calculados os coeficientes de assimetria (Skewness) e o coeficiente de curtose (Kurtosis), sendo considerada uma distribuição Gaussiana quando o coeficiente de assimetria apresentou valores entre -1 e +1. A apresentação das variáveis quantitativas foi realizada através das medidas descritivas (média e desvio padrão), enquanto que as semi-quantitativas foram apresentadas em termos de frequência. As diferenças entre as médias foram avaliadas usando o teste t não-pareado para comparar dois grupos, enquanto que as diferenças de frequência foram avaliadas usando o teste de chi-quadrado. O nível de concordância entre os métodos de diagnóstico foi analisado através do Índice Kappa. Todos os testes foram bicaudais e a significância estatística considerada quando p apresentou um valor inferior a 0,05.

4.3 RESULTADOS

A frequência da infecção por *S. stercoralis* através dos métodos parasitológicos foi de 21,4% (74/345), com a carga parasitária variando de 1 a 958 larvas/grama de fezes e uma média e desvio padrão de 47,6 e 150 larvas/grama de fezes, respectivamente. Os ELISAS para detecção dos diferentes isotipos e subtipos de anticorpos específicos (IgG, IgG1, IgG4 e IgE e IgA1), demonstraram sensibilidades e especificidades elevadas, principalmente o IgG4 e o IgE-ELISA (Figura 1 e 2). As prováveis reações cruzadas ocorreram apenas com os soros de pacientes infectados com *Schistosoma mansoni* e ancilostomídeo, sendo a maior taxa de reações cruzadas encontrada no IgG-ELISA, 40% (8/20) (Figura 1). Embora o IgE-ELISA tenha demonstrado elevadas sensibilidade e especificidade, nos pacientes alcoolistas a pesquisa de anticorpos das classes IgA1 e IgG4 foram capazes de detectar um número maior de indivíduos com eliminação de larvas nas fezes, 80 (59/74) e 85% (63/74), respectivamente (Tabela 1). Um total de 30% (22/74) dos alcoolistas com eliminação de larvas nas fezes foram negativos para a pesquisa de IgE específico. Além disso, a média da carga parasitária nos

indivíduos IgE-ELISA positivos foi significativamente menor que os indivíduos negativos, 41,4 e 62,2 larvas/grama de fezes, respectivamente ($p < 0,01$) (Figura 3). Um resultado similar foi observado na detecção de anticorpos da classe IgA1, onde a média da carga parasitária nos alcoolistas com eliminação de larvas nas fezes e IgA1-ELISA negativo e positivo foi de 72,7 e 42,5 larvas/grama de fezes, respectivamente ($p < 0,01$) (Figura 3). Entre os pacientes sem eliminação de larvas nas fezes, foi encontrada uma positividade de 20,3% (55/271) no IgA1-ELISA (Tabela 1).

Apenas 57% (42/74) dos indivíduos com resultado parasitológico positivo apresentaram IgG1-ELISA positivo (Tabela 1). Além do mais, a média da densidade óptica dos soros avaliados no IgG1-ELISA para os pacientes alcoolistas infectados com *S. stercoralis* foi estatisticamente menor comparada aos pacientes não alcoolistas infectados ($p < 0,05$), sendo observada uma correlação negativa estatisticamente significativa entre a carga parasitária e os níveis de IgG1 específico ($r = -0,273$) (Tabela 1).

Após teste prévio no immunoblotting com vários isotipos e subtipos de anticorpos, foi demonstrado que a marcação com IgA1 demonstrou reatividade nas bandas de 90, 75, 26 e/ou 17 kDa na maioria dos soros de pacientes infectados com *S. stercoralis*, com eliminação de larvas nas fezes, sendo este anticorpo escolhido para o teste confirmatório (dados ainda não publicado). Neste trabalho foi observada imunorreatividade em 92% (33/36) dos alcoolistas com eliminação de larvas nas fezes e ELISA negativo para uma ou mais classes de anticorpos, sendo que o IgG4-ELISA apresentou a maior concordância com o Imunoblotting.

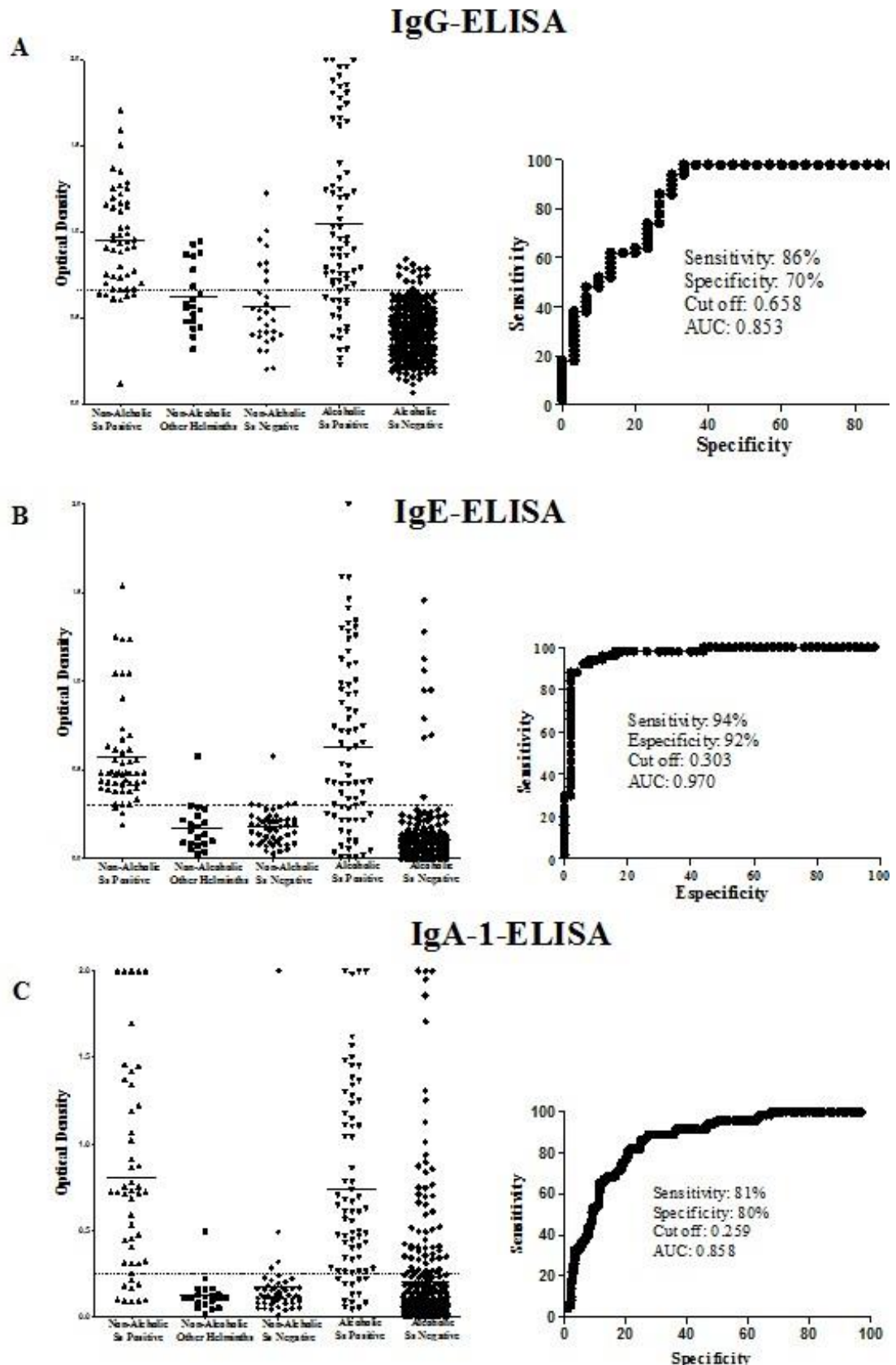


Figura 1. ELISA para detecção de níveis séricos de IgG, IgE e IgA1 anti- *S. stercoralis* em pacientes atendidos do CATA e no LACTFAR, UFBA. 100 indivíduos não alcoolistas: 50 infectados com *S. stercoralis* (▲); 20 infectados com outras parasitoses intestinais (■); 30 adultos aparentemente saudáveis, com exame parasitológico negativo (●). 345 pacientes alcoolistas: 74 infectados com *Strongyloides stercoralis* (▼); 271 de pacientes sem infecção por *S. stercoralis* (◆). Curva ROC indicando sensibilidade, especificidade, ponto de corte e área sob a curva ROC (AUC) para detecção de IgG, IgE e IgA1 específicos.

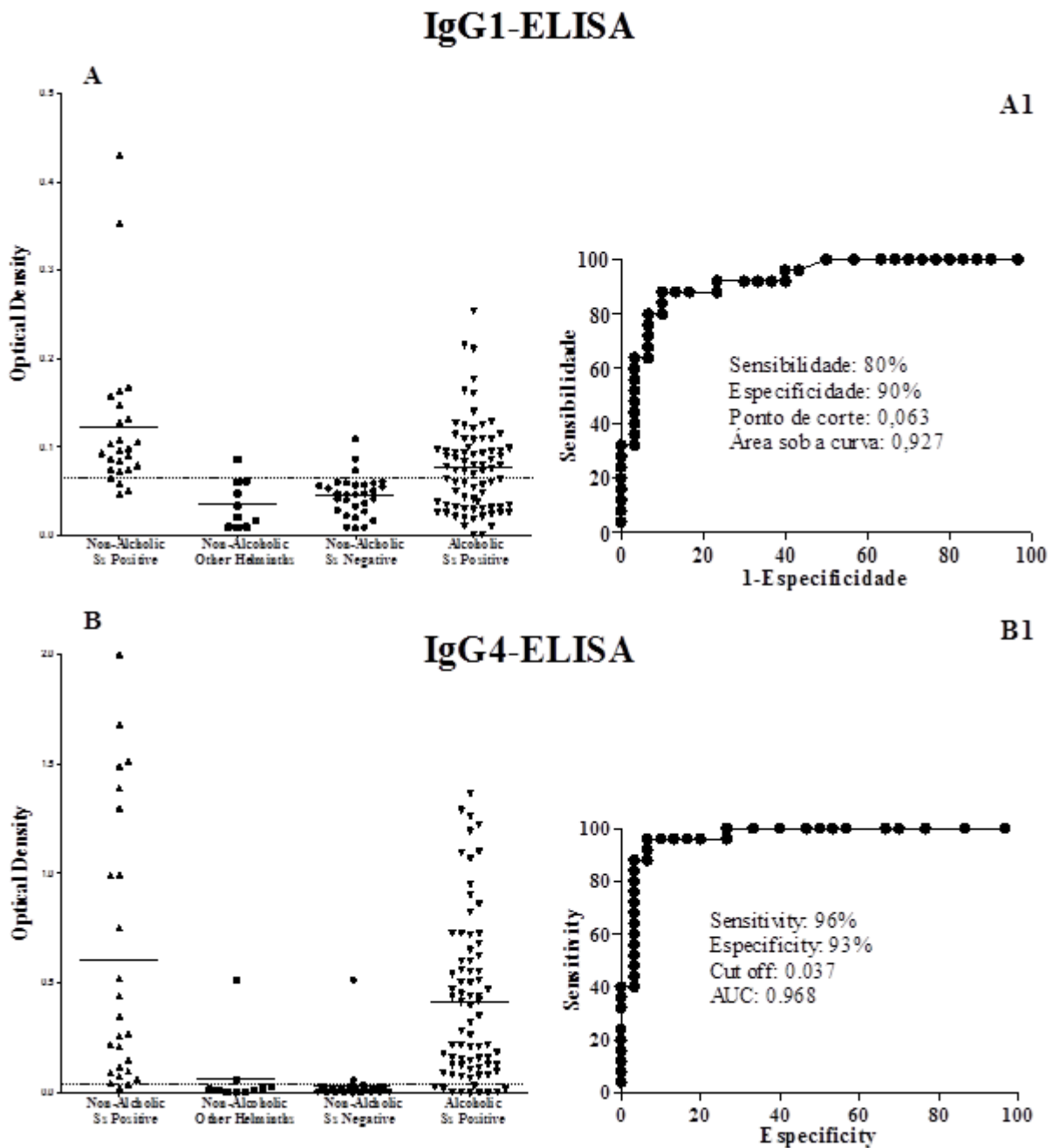


Figura 2. ELISA para detecção de níveis séricos de IgG1 (A) e IgG4 (B) anti- *S. stercoralis* em soros de pacientes atendidos no CATA e na Faculdade de Farmácia, UFBA. 55 não alcoolistas, sendo 25 infectados com *S. stercoralis* (▲); 10 monoparasitados com outras parasitoses intestinais; 20 de indivíduos adultos saudáveis (■) e 74 pacientes alcoolistas infectados com *S. stercoralis*. Curva ROC indicando sensibilidade, especificidade, ponto de corte e área sob a curva ROC (AUC) para detecção de IgG1 (A1) e IgG4 (B1) em amostras de soro.

Tabela 1. Avaliação dos níveis de anticorpos específicos IgG, IgE, IgA, IgG1 e IgG4 em pacientes infectados com *S. stercoralis* alcoolistas (n=74) e não alcoolistas (n=50 para IgG, IgE e IgA1 e n=25 para IgG1 e IgG4) e alcoolistas não infectados (n=271) e correlação entre a densidade óptica e a carga parasitária nos pacientes alcoolistas (n=74).

Anticorpos	Média da Densidade Óptica		Frequência em indivíduos alcoolistas (%)			Correlação com a Carga Parasitária ¹	
	Controle Positivo ²	Alcoolista	Parasitológico positivo	Parasitológico negativo	Total	R	p
IgG	0,958	1,053	77 (57/74)	5,2 (14/271)	20,6 (71/345)	-0,048	0,687
IgE	0,574	0,633	70 (52/74)	3,7 (10/271)	18 (62/345)	-0,151	0,197
IgA1	0,809	0,734	80 (59/74)	20,3 (55/271)	33 (114/338)	0,080	0,501
IgG1	0,123	0,077*	57 (42/74)	-	-	-0,273	0,019*
IgG4	0,603	0,417	85 (63/74)	-	-	-0,194	0,099

* p<0,05, Unpaired T test

¹Teste de Pearson, ²p<0,05

²indivíduos não alcoolistas infectados com *S. stercoralis* atendidos no LACTFAR/UFBA

³Índice kappa de concordância entre os métodos parasitológicos e os respectivos ELISAs

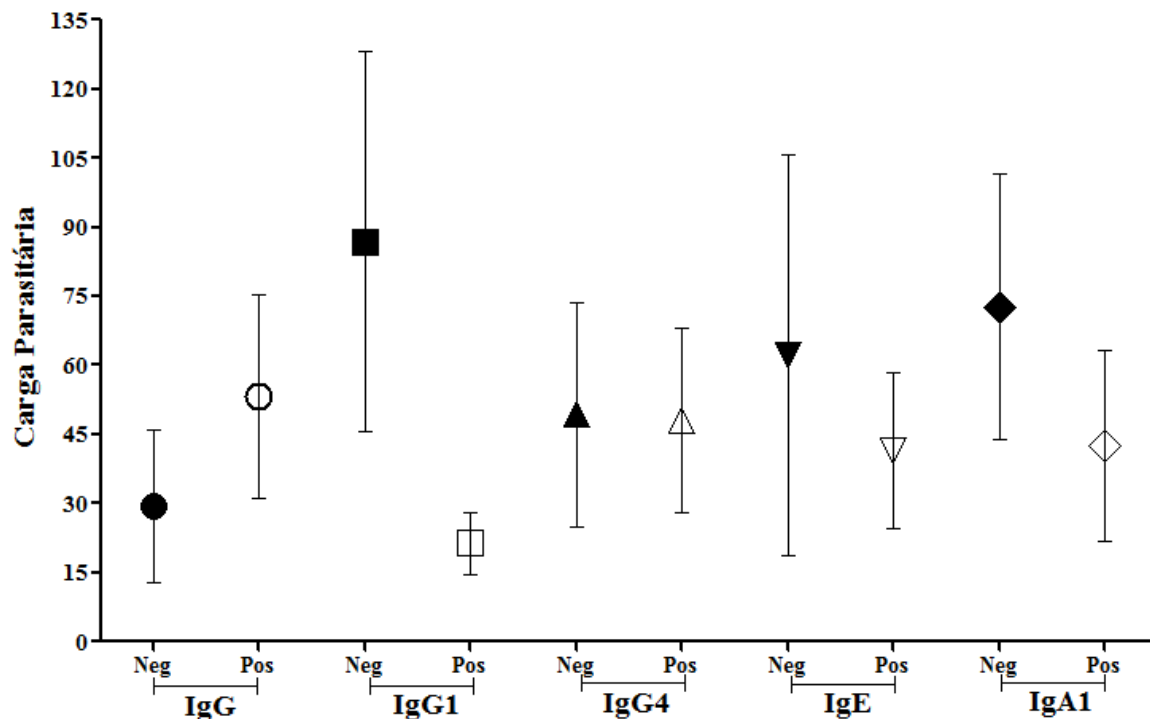
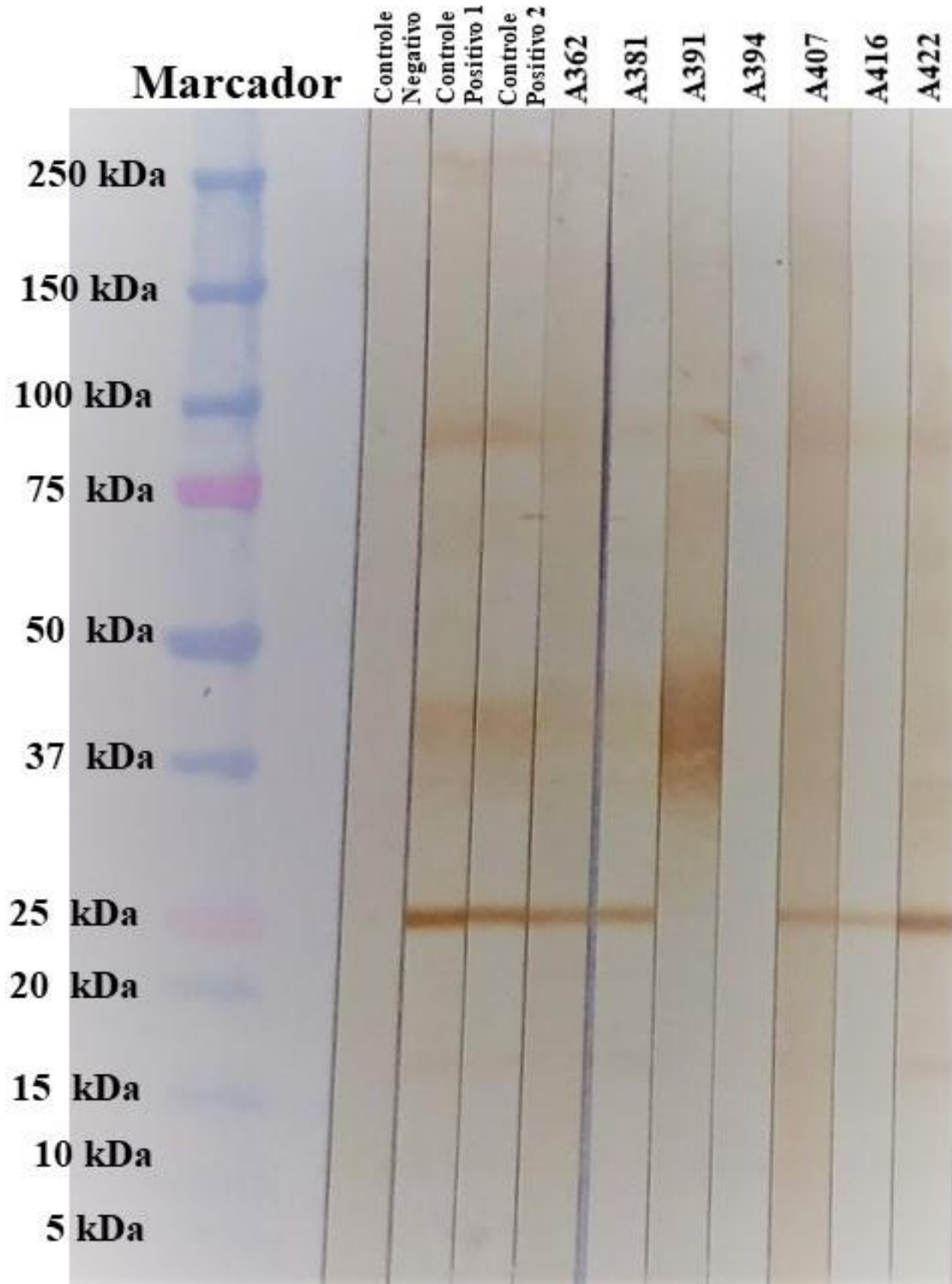


Figura 3. Média e desvio padrão da carga parasitária em alcoolistas com eliminação de larvas de *S. stercoralis* nas fezes (n=74) positivos ou negativos para os diferentes isotipos de anticorpos específicos no ELISA.

Figura 4. Representação do Immunoblotting para detecção de IgA1 anti-*S. stercoralis* usando antígeno de membrana de *S. venezuelensis* e soros de pacientes com resultado parasitológico positivo, mas negativo no ELISA para detecção de uma ou mais classes de anticorpos (n=36). Controles negativo e positivo 1 e 2. Bandas específicas nas regiões de 90, 75, 26 e 17 kDa.



4.4 DISCUSSÃO

A infecção por *S. stercoralis* pode evoluir para os quadros graves de hiperinfecção e/ou disseminação em pacientes imunocomprometidos. Em um estudo prévio, desenvolvido em nosso laboratório, a frequência da infecção em pacientes alcoolistas foi de 23,5% (27), o que está de acordo com o resultado encontrado neste trabalho. Outros autores também apontam para uma elevada prevalência da estrogiloidíase em pacientes alcoolistas, variando de 20,5 a 40,2% (23,25–27). Provavelmente, esta prevalência está subestimada, uma vez que a intermitência na liberação das larvas e a flutuação da carga parasitária podem influenciar na sensibilidade dos métodos de diagnóstico parasitológico (33). Os métodos sorológicos são uma alternativa para o diagnóstico da estrogiloidíase que independem da eliminação de larvas, mais que ainda carecem de mais estudos que busquem elevar suas sensibilidades e especificidades, além de eliminar as reações cruzadas com outros helmintos.

Neste trabalho, os ELISAs para detecção de três diferentes classes de anticorpos circulantes, IgG, IgE e IgA1, demonstraram sensibilidades e especificidades variando de 81 a 94% e 70 a 92%, respectivamente, concordando com dados publicados anteriormente (17,26,35,108,214,218–220). A detecção de anticorpos IgG específico é o método mais utilizado para o diagnóstico, provavelmente por ser a imunoglobulina circulante mais abundante (134). No entanto, o seu uso tem demonstrado restrições, especialmente em decorrência da elevada frequência de reações cruzadas com outras infecções helmínticas e a persistência da memória imunológica, que dificultam a distinção entre infecções recentes e passadas (36). Neste trabalho, o IgG-ELISA apresentou o maior número de reações cruzadas com soros de pacientes infectados com outros helmintos, principalmente *Schistosoma mansoni* e ancilostomídeos, apresentando a menor especificidade entre os anticorpos testados (70%), o que está de acordo com outros estudos (26,35,108). As reações positivas para IgG específico em indivíduos sem eliminação de larvas nas fezes foi 5,2% (14/271), possivelmente pela baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos, presença de reações cruzadas e/ou memória imunológica (36,155).

O IgG pode ser dividido em quatro subclasses, denominadas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (221). Embora apresentem mais de 90% de similaridade a nível de aminoácidos, cada subclasse possui um perfil exclusivo em relação à ligação ao antígeno, formação do complexo imune, ativação do complemento, estímulo de células efectoras e meia-vida (222). A deficiência seletiva de subclasses geralmente não é prejudicial ao indivíduo, mas pode levar a uma maior susceptibilidade a determinados agentes patogênicos (17,222). Neste trabalho, o ELISA para detecção das subclasses IgG1 e IgG4 específicas foi realizado apenas nos

indivíduos alcoolistas com eliminação de larvas nas fezes. Apesar das elevadas sensibilidades e especificidades do IgG1-ELISA, a imunorreatividade nos pacientes alcoolistas foi de apenas 57% (42/74). Adicionalmente, a média da densidade ótica nos indivíduos alcoolistas infectados foi significativamente menor do que nos indivíduos não alcoolistas infectados, demonstrando pela primeira vez na literatura, de nosso conhecimento, uma baixa reatividade IgG1-específica nos alcoolistas. Este fato pode estar relacionado com o agravamento da estrogiloidíase, uma vez que o IgG1 específico foi o único anticorpo que apresentou uma correlação negativa com a carga parasitária ($p < 0,05$). Essa hipótese é corroborada pela elevada carga parasitária nos indivíduos alcoolistas IgG1-ELISA negativos. Por outro lado, não se observou diferenças entre o nível de IgG4 nos indivíduos alcoolistas e não alcoolistas infectados com *S. stercoralis*, demonstrando uma resposta preservada a IgG4 nos alcoolistas. Além do mais, o IgG4-ELISA detectou o maior número de indivíduos alcoolistas com liberação de larvas nas fezes, confirmando o seu potencial para ser usado no diagnóstico da estrogiloidíase

O IgE específico tem sido associado à resistência adquirida à autoinfecção, resultando em uma diminuição da carga parasitária (217). Apesar da elevada sensibilidade do IgE-ELISA, 30% (22/74) dos soros de pacientes alcoolistas com eliminação de larvas nas fezes foram negativos, indicando uma baixa resposta IgE-específica. Ademais, foi observado que a média da carga parasitária foi significativamente maior nos alcoolistas negativos no IgE-ELISA, em relação aos alcoolistas IgE-ELISA positivos ($p < 0,05$), o que pode indicar um aumento do número de parasitos na ausência de uma resposta IgE-específica. A resposta imune em indivíduos alcoolistas ainda não está completamente esclarecida, mas vários estudos demonstram um perfil de resposta inflamatória no alcoolismo, responsável por várias das manifestações patogênicas desta doença (223). Em contrapartida, altos níveis de IgE total têm sido reportado (147,223–225). Esta é o primeiro estudo, de nosso conhecimento, onde se demonstra uma baixa resposta IgE específica em indivíduos alcoolistas. Mais estudos são necessários para esclarecer esta correlação.

A presença do *S. stercoralis* na submucosa intestinal, provavelmente, estimula a produção local de IgA específica, a qual modula a infecção e limita o número de larvas excretadas nas fezes (16,108,109,111,112). Neste estudo, o IgA1-ELISA foi capaz de detectar 80% (59/74) dos pacientes alcoolistas com eliminação de larvas nas fezes, sendo o segundo anticorpo com maior sensibilidade para o diagnóstico estrogiloidíase em pacientes alcoolistas. No entanto, 20,3% (55/271) dos pacientes alcoolistas sem eliminação de larvas nas fezes foram IgA1-ELISA positivo, enquanto que nos pacientes não alcoolistas apenas

10% (3/30) foram positivos. O IgA, quando presente, pode atuar na destruição do parasito, o que explica a não eliminação de larvas nas fezes.

O immunoblotting tem sido utilizado para confirmar o diagnóstico de doenças infecciosas, tais como a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH). Proteínas imunodominantes com peso molecular variando de 15 a 150 kDa foram descritas em reações a antígeno de *S. venezuelensis* com soros de indivíduo infectado com *S. stercoralis* (194,205,215). Neste trabalho, o immunoblotting utilizando antígeno de membrana de *S. venezuelensis*, padronizado para detecção de IgA1 anti-*S. stercoralis* (ver Capítulo 3), foi positivo, em 92% (33/36) dos pacientes com eliminação de larvas nas fezes e negativos no ELISA, para uma ou mais classes de anticorpos, o que demonstra a superioridade deste método em relação ao ELISA, mesmo quando o nível de anticorpos é baixo (162).

Em conclusão, o IgG1 e o IgE-ELISA apresentaram elevadas sensibilidades e especificidades para o diagnóstico da estrogiloidíase, no entanto foi encontrada uma baixa reatividade para os alcoolistas. Além disso, foi observada um aumento na carga parasitária nos alcoolistas com a pesquisa destes anticorpos negativa. Possivelmente, a ingestão crônica de álcool interfere na produção do IgG1 e IgE e, portanto, estes anticorpos não são indicados para o diagnóstico da estrogiloidíase nestes pacientes. O IgG4 e o IgA1-ELISA demonstraram as maiores sensibilidades e especificidades no imunodiagnóstico da estrogiloidíase em alcoolistas. O immunoblotting com reatividade nas bandas de 90, 75, 26 e/ou 17 kDa para pesquisa de anticorpos da classe IgA1 pode ser uma ferramenta para confirmar o diagnóstico da infecção por *S. stercoralis*, nos casos discordantes entre o exame parasitológico de fezes e o ELISA.

CAPÍTULO 5
CONCLUSÃO

Dessa forma, podemos concluir que:

1. O antígeno de membrana de *S. venezuelensis* apresentou melhor aplicabilidade para o diagnóstico da infecção por *S. stercoralis* através do immunoblotting;
2. O immunoblotting marcado com anticorpos IgA1 apresenta melhor sensibilidade e especificidade que o marcado com IgG;
3. As moléculas na faixa de 17, 26, 75 e 90 kDa do antígeno de membrana *do S. venezuelensis* marcadas com IgA1 podem ser usadas como padrões no diagnóstico da estrogiloidíase, além de serem potenciais candidatas para desenvolvimento de uma proteína recombinante
4. Os antígenos recombinantes NIE e SsIR apresentaram uma elevada frequência de reações cruzadas;
5. O IgE e o IgG1-ELISA apresentaram elevadas sensibilidades e especificidades para o diagnóstico da estrogiloidíase, no entanto uma baixa reatividade para os alcoolistas, não sendo indicados para o diagnóstico da estrogiloidíase nestes pacientes.
6. Foi observado um aumento estatisticamente significativo na carga parasitária dos pacientes alcoolistas infectados com *S. stercoralis* e IgE e IgG1-ELISA negativos
7. O IgG4 e o IgA1-ELISA apresentaram as maiores sensibilidades e especificidades no imunodiagnóstico da estrogiloidíase em pacientes alcoolistas através do ELISA;
8. Este trabalho abre um precedente para estudos futuros no uso de diferentes classes e subclasses de anticorpos para diagnóstico e avaliação da resposta imune na infecção por *S. stercoralis* e levanta a necessidade do desenvolvimento de antígenos recombinantes voltados para o diagnóstico da estrogiloidíase em grupos de risco em áreas endêmicas.

REFERÊNCIAS

1. Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *The Lancet*. 12 de maio de 2006;367(9521):1521–32.
2. Ashford RW, Barnish G, Viney ME. *Strongyloides fuelleborni kellyi*: Infection and disease in Papua New Guinea. *Parasitol Today*. Setembro de 1992;8(9):314–8.
3. Puthiyakunnon S, Boddu S, Li Y, Zhou X, Wang C, Li J, et al. Strongyloidiasis—An Insight into Its Global Prevalence and Management. *PLoS Negl Trop Dis*. 14 de agosto de 2014;8(8):e3018.
4. Schär F, Trostorf U, Giardina F, Khieu V, Muth S, Marti H, et al. *Strongyloides stercoralis*: Global Distribution and Risk Factors. *PLoS Negl Trop Dis*. 11 de julho de 2013;7(7):e2288.
5. Nutman TB. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. *Parasitology*. Março de 2017;144(3):263–73.
6. Mendes T, Minori K, Ueta M, Miguel DC, Allegretti SM. Strongyloidiasis Current Status with Emphasis in Diagnosis and Drug Research. *J Parasitol Res*. 22 de janeiro de 2017;2017:e5056314.
7. Olsen A, Lieshout L van, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, et al. Strongyloidiasis – the most neglected of the neglected tropical diseases? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 10 de janeiro de 2009;103(10):967–72.
8. Cabral AC, Iñiguez AM, Moreno T, Bóia MN, Carvalho-Costa FA, Cabral AC, et al. Clinical conditions associated with intestinal strongyloidiasis in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. Junho de 2015;48(3):321–5.
9. Galioto AM, Hess JA, Nolan TJ, Schad GA, Lee JJ, Abraham D. Role of Eosinophils and Neutrophils in Innate and Adaptive Protective Immunity to Larval *Strongyloides stercoralis* in Mice. *Infect Immun*. 10 de janeiro de 2006;74(10):5730–8.
10. Watanabe K, Noda K, Hamano S, Koga M, Kishihara K, Nomoto K, et al. The crucial role of granulocytes in the early host defense against *Strongyloides ratti* infection in mice. *Parasitol Res*. Março de 2000;86(3):188–93.
11. Bonne-Année S, Hess JA, Abraham D. Innate and adaptive immunity to the nematode *Strongyloides stercoralis* in a mouse model. *Immunol Res*. Dezembro de 2011;51(2–3):205–14.
12. Montes M, Sanchez C, Verdonck K, Lake JE, Gonzalez E, Lopez G, et al. Regulatory T Cell Expansion in HTLV-1 and Strongyloidiasis Co-infection Is Associated with Reduced IL-5 Responses to *Strongyloides stercoralis* Antigen. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 9 de junho de 2009;3(6).
13. Keiser PB, Nutman TB. *Strongyloides stercoralis* in the Immunocompromised Population. *Clin Microbiol Rev*. 1º de janeiro de 2004;17(1):208–17.
14. Iriemenam NC, Sanyaolu AO, Oyibo WA, Fagbenro-Beyioku AF. *Strongyloides stercoralis* and the immune response. *Parasitol Int*. Março de 2010;59(1):9–14.

15. Porto AF, Neva FA, Bittencourt H, Lisboa W, Thompson R, Alcântara L, et al. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. *Parasite Immunol.* Setembro de 2001;23(9):503–7.
16. Atkins NS, Lindo JF, Lee MG, Conway DJ, Bailey JW, Robinson RD, et al. Humoral responses in human strongyloidiasis: correlations with infection chronicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 10 de janeiro de 1997;91(5):609–13.
17. Rodrigues RM, de Oliveira MC, Sopenete MC, Silva DAO, Campos DMB, Taketomi EA, et al. IgG1, IgG4, and IgE antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen. *Parasitol Res.* Outubro de 2007;101(5):1209–14.
18. Bisoffi Z, Buonfrate D, Montresor A, Requena-Méndez A, Muñoz J, Krolewiecki AJ, et al. *Strongyloides stercoralis*: A Plea for Action. *PLoS Negl Trop Dis.* 9 de maio de 2013;7(5):e2214.
19. Corti M. *Strongyloides stercoralis* in Immunosuppressed Patients. *Arch Clin Infect Dis* [Internet]. janeiro de 2016;11(1).
20. Teixeira MCA, Pacheco FTF, Souza JN, Silva M, Inês EJ, et al. *Strongyloides stercoralis* Infection in Alcoholic Patients. *BioMed Res Int.* 26 de dezembro de 2016;2016:e4872473.
21. de Souza JN, Machado PR, Teixeira MC, Soares NM. Recurrence of *Strongyloides stercoralis* infection in a patient with Hansen’s disease: a case report. *Lepr Rev.* 2014;85(1):58–62.
22. Chieffi PP, Chiattoni CS, Feltrim EN, Alves RC, Paschoalotti MA. Coinfection by *Strongyloides stercoralis* in blood donors infected with human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 in São Paulo city, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* outubro de 2000;95(5):711–2.
23. Furtado KCYO, Costa CA da, Ferreira L de SC, Martins LC, Linhares A da C, Ishikawa EAY, et al. Occurrence of strongyloidiasis among patients with HTLV-1/2 seen at the outpatient clinic of the Núcleo de Medicina Tropical, Belém, State of Pará, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* Abril de 2013;46(2):241–3.
24. Porto MAF, Muniz A, Oliveira Júnior J, Carvalho EM. Clinical and immunological consequences of the association between HTLV-1 and strongyloidiasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* Dezembro de 2002;35(6):641–9.
25. Koticha A, Kuyare S, Nair J, Athvale A, Mehta P. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome in patients on prolonged steroid treatment: two case reports. *J Indian Med Assoc.* Abril de 2013;111(4):272–4.
26. de Souza JN, Inês EDJ, Santiago M, Teixeira MCA, Soares NM. *Strongyloides stercoralis* infection in patients with systemic lupus erythematosus: diagnosis and prevention of severe strongyloidiasis. *Int J Rheum Dis.* 1º de agosto de 2015.
27. Silva MLS, de J. Inês E, da S. Souza AB, dos S. Dias VM, Guimarães CM, Menezes ER, et al. Association between *Strongyloides stercoralis* infection and cortisol secretion

- in alcoholic patients. *Acta Trop.* Fevereiro de 2016;154:133–8.
28. Marques CC, Zago-Gomes M da P, Gonçalves CS, Pereira FEL. Alcoholism and *Strongyloides stercoralis*: Daily Ethanol Ingestion Has a Positive Correlation with the Frequency of *Strongyloides* Larvae in the Stools. *PLoS Negl Trop Dis.* 22 de junho de 2010;4(6):e717.
 29. Zago-Gomes MP, Aikawa KF, Perazzio SF, Gonçalves CS, Pereira FEL. Prevalence of intestinal nematodes in alcoholic patients. *Rev Soc Bras Med Trop.* Dezembro de 2002;35(6):571–4.
 30. Gaburri D, Gaburri AK Ga, Hubner E, Lopes MH, Ribeiro AM, de Paulo GA, et al. [Intestinal parasitosis and hepatic cirrhosis]. *Arq Gastroenterol.* dezembro de 1996;34(1):7–12.
 31. Oliveira LCM de, Ribeiro CT, Mendes DM, Oliveira TC, Costa-Cruz JM. Frequency of *Strongyloides stercoralis* Infection in Alcoholics. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Janeiro de 2002;97(1):119–21.
 32. MacGregor RR. Alcohol and immune defense. *JAMA.* 19 de setembro de 1986;256(11):1474–9.
 33. Inês E de J, Souza JN, Santos RC, Souza ES, Santos FL, Silva MLS, et al. Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. *Acta Trop.* Dezembro de 2011;120(3):206–10.
 34. Sato Y, J K, H T, Y S. Efficacy of stool examination for detection of *Strongyloides* infection. *Am J Trop Med Hyg.* Setembro de 1995;53(3):248–50.
 35. Inês E de J, Silva MLS, Souza JN, Teixeira MCA, Soares NM. The role of glycosylated epitopes in the serodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Maio de 2013;76(1):31–5.
 36. van Doorn HR, Koelewijn R, Hofwegen H, Gilis H, Wetsteyn JCFM, Wismans PJ, et al. Use of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Dipstick Assay for Detection of *Strongyloides stercoralis* Infection in Humans. *J Clin Microbiol.* 2 de janeiro de 2007;45(2):438–42.
 37. Levenhagen MA, Costa-Cruz JM. Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. *Acta Trop.* Julho de 2014;135:33–43.
 38. Beknazarova M, Whiley H, Ross K. Strongyloidiasis: A disease of socioeconomic disadvantage. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(5).
 39. Normand A. Sur la maladie dite diarrhé de Cochinchine. *CR Acad Sci Paris.* 1983;83:316.
 40. Cimino RO, Krolewiecki A. The Epidemiology of Human Strongyloidiasis. *Curr Trop Med Rep.* 1º de dezembro de 2014;1(4):216–22.
 41. Viney M. Strongyloides. *Parasitology.* Março de 2017;144(3):259–62.

42. Neves DP, de Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. *Parasitologia Humana*. 12^o ed. São Paulo: Atheneu; 2011. 546 p.
43. Robson D, Welch E, Beeching NJ, Gill GV. Consequences of captivity: health effects of far East imprisonment in World War II. *QJM Int J Med*. 1^o de fevereiro de 2009;102(2):87–96.
44. Czachor JS, Jonas AP. Transmission of *Strongyloides stercoralis* Person to Person. *J Travel Med*. 1^o de julho de 2000;7(4):211–2.
45. Sugiyama K, Hasegawa Y, Nagasawa T, Hitomi S. Exposure of medical staff to *Strongyloides stercoralis* from a patient with disseminated strongyloidiasis. *J Infect Chemother Off J Jpn Soc Chemother*. Agosto de 2006;12(4):217–9.
46. Said T, Nampoory MRN, Nair MP, Halim MA, Shetty SA, Kumar AV, et al. Hyperinfection strongyloidiasis: an anticipated outbreak in kidney transplant recipients in Kuwait. *Transplant Proc*. Maio de 2007;39(4):1014–5.
47. Ben-Youssef R, Baron P, Edson F, Raghavan R, Okechukwu O. *Strongyloides stercoralis* infection from pancreas allograft: case report. *Transplantation*. 15 de outubro de 2005;80(7):997–8.
48. Patel G, Arvelakis A, Sauter BV, Gondolesi GE, Caplivski D, Huprikar S. *Strongyloides* hyperinfection syndrome after intestinal transplantation. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc*. Abril de 2008;10(2):137–41.
49. Guillamet LJV, Saul Z, Miljkovic G, Vilchez GA, Mendonca N, Gourineni V, et al. *Strongyloides stercoralis* Infection Among Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected Patients in the United States of America: A Case Report and Review of Literature. *Am J Case Rep*. 3 de abril de 2017;18:339–46.
50. Chang PCH, Graham GL. Parasitism, parthenogenesis and polyploidy: the life cycle of *Strongyloides papillosus*. *J Parasitol*. 1957;43(5):13.
51. Harvey SC, Viney ME. Sex determination in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. *Genetics*. Agosto de 2001;158(4):1527–33.
52. Viney ME. Exploiting the life cycle of *Strongyloides ratti*. *Parasitol Today Pers Ed*. junho de 1999;15(6):231–5.
53. Harvey SC, Gemmill AW, Read AF, Viney ME. The control of morph development in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. *Proc R Soc B Biol Sci*. 22 de outubro de 2000;267(1457):2057–63.
54. Requena-Mendez A, Buonfrate D, Bisoffi Z, Gutiérrez JM. Advances in the Diagnosis of Human Strongyloidiasis. *Curr Trop Med Rep*. 1^o de dezembro de 2014;1(4):207–15.
55. Grove DI. Human strongyloidiasis. *Adv Parasitol*. Dezembro de 1995;38:251–309.
56. Neva FA. Biology and Immunology of Human Strongyloidiasis. *J Infect Dis*. 1^o de março de 1986;153(3):397–406.

57. Prendki V, Fenaux P, Durand R, Thellier M, Bouchaud O. Strongyloidiasis in Man 75 Years after Initial Exposure. *Emerg Infect Dis*. Maio de 2011;17(5):931–2.
58. Freedman DO. Experimental Infection of Human Subjects with *Strongyloides* Species. *Rev Infect Dis*. 1º de novembro de 1991;13(6):1221–6.
59. Hira PR, Patel BG. *Strongyloides fülleborni* infections in man in Zambia. *Am J Trop Med Hyg*. Julho de 1977;26(4):640–3.
60. Krolewiecki AJ, Ramanathan R, Fink V, McAuliffe I, Cajal SP, Won K, et al. Improved Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* Using Recombinant Antigen-Based Serologies in a Community-Wide Study in Northern Argentina. *Clin Vaccine Immunol*. Outubro de 2010;17(10):1624–30.
61. Khieu V, Schär F, Forrer A, Hattendorf J, Marti H, Duong S, et al. High Prevalence and Spatial Distribution of *Strongyloides stercoralis* in Rural Cambodia. *PLoS Negl Trop Dis*. 12 de junho de 2014;8(6):e2854.
62. Pires ML, Dreyer G. Revendo a importancia do *Strongyloides stercoralis*. *Rev Hosp Clínicas*. Agosto de 1993;48(4):175–82.
63. Glinz D, Silué KD, Knopp S, Lohourignon LK, Yao KP, Steinmann P, et al. Comparing Diagnostic Accuracy of Kato-Katz, Koga Agar Plate, Ether-Concentration, and FLOTAC for *Schistosoma mansoni* and Soil-Transmitted Helminths. *PLoS Negl Trop Dis*. 20 de julho de 2010;4(7).
64. Schär F, Giardina F, Khieu V, Muth S, Vounatsou P, Marti H, et al. Occurrence of and risk factors for *Strongyloides stercoralis* infection in South-East Asia. *Acta Trop*. Julho de 2016;159:227–38.
65. Buonfrate D, Baldissera M, Abrescia F, Bassetti M, Caramaschi G, Giobbia M, et al. Epidemiology of *Strongyloides stercoralis* in northern Italy: results of a multicentre case–control study, February 2013 to July 2014. *Eurosurveillance*. 4 de agosto de 2016;21(31).
66. Egido JM, De Diego JA, Penin P. The prevalence of enteropathy due to strongyloidiasis in Puerto Maldonado (Peruvian Amazon). *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis*. Junho de 2001;5(3):119–23.
67. Yori PP, Kosek M, Gilman RH, Cordova J, Bern C, Chavez CB, et al. Seroepidemiology of strongyloidiasis in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 1º de janeiro de 2006;74(1):97–102.
68. Buonfrate D, Mena MA, Angheben A, Requena-Mendez A, Muñoz J, Gobbi F, et al. Prevalence of strongyloidiasis in Latin America: a systematic review of the literature. *Epidemiol Infect*. Julho de 2014;FirstView:1–9.
69. Menghi CI, Iuvaro FR, Dellacasa MA, Gatta CL. [Survey of intestinal parasites among an aboriginal community in Salta]. *Medicina (Mex)*. 2007;67(6 Pt 2):705–8.
70. Taranto NJ, Cajal SP, De Marzi MC, Fernández MM, Frank FM, Brú AM, et al. Clinical status and parasitic infection in a Wichí Aboriginal community in Salta,

- Argentina. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1º de outubro de 2003;97(5):554–8.
71. Zonta ML, Oyhenart EE, Navone GT. Nutritional status, body composition, and intestinal parasitism among the Mbyá-Guaraní communities of Misiones, Argentina. *Am J Hum Biol Off J Hum Biol Counc.* Abril de 2010;22(2):193–200.
 72. Peplow D. [Intestinal parasites among the populations of various regions of Ecuador: statistical study]. *Boletín Oficina Sanit Panam Pan Am Sanit Bur.* Setembro de 1982;93(3):233–9.
 73. Jacobsen KH, Ribeiro PS, Quist BK, Rydbeck BV. Prevalence of Intestinal Parasites in Young Quichua Children in the Highlands of Rural Ecuador. *J Health Popul Nutr.* Dezembro de 2007;25(4):399–405.
 74. Cooper PJ, Guevara A, Guderian RH. Intestinal helminthiases in Ecuador: the relationship between prevalence, genetic, and socioeconomic factors. *Rev Soc Bras Med Trop.* Setembro de 1993;26(3):175–80.
 75. de Paula FM, de Castro E, Gonçalves-Pires M d, Marçal M d, Campos DM, Costa-Cruz JM. Parasitological and immunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* Fevereiro de 2000;42(1):51–5.
 76. Miné JC [UNESP. Caracterização de cepas de *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1876) Stiles & Hassal, 1902 (Rhabditida, Strongyloididae) isoladas de pacientes com e sem sintomatologia da região de Araraquara-SP. *Aleph.* 25 de novembro de 2009;126 f.
 77. Marques SMT, Bandeira C, Quadros RM. Prevalência de enteroparasitoses em Concórdia, Santa Catarina, Brasil. *Parasitol Latinoam.* Junho de 2005;60(1–2):78–81.
 78. Machado ER, Costa-Cruz JM, Freitas CV de. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in individuals of rural area of Uberlandia, Minas Gerais State, Brazi. *Rev Patol Trop.* Junho de 2010;39(2):115–22.
 79. Kobayashi J, Hasegawa H, Forli AA, Nishimura NF, Yamanaka A, Shimabukuro T, et al. Prevalence of intestinal parasitic infection in five farms in Holambra, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* Fevereiro de 1995;37(1):13–8.
 80. Santos LP, Santos FLN, Soares NM. Prevalência de parasitoses intestinais em pacientes atendidos no Hospital Universitário Professor Edgar Santos, Salvador- Bahia. *Rev Patol Trop.* Dezembro de 2007;36(3):237–46.
 81. Paula FM, Costa-Cruz JM. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. *Parasitology.* Setembro de 2011;138(11):1331–1340.
 82. Carvalho EM, Porto AF. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. *Parasite Immunol.* 1º de novembro de 2004;26(11–12):487–97.
 83. Valar C, Keitel E, Dal PRL, Gnatta D, Santos AF, Bianco PD, et al. Parasitic infection in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* Março de 2007;39(2):460–2.

84. Graeff-Teixeira C, Leite CS, Sperhackle CL, Fassina K, Petry SM, Mucenic T, et al. Prospective study of strongyloidosis in patients with hematologic malignancies. *Rev Soc Bras Med Trop*. Outubro de 1997;30(5):355–7.
85. Schaffel R, Nucci M, Carvalho E, Braga M, Almeida L, Portugal R, et al. The value of an immunoenzymatic test (enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients immunosuppressed by hematologic malignancies. *Am J Trop Med Hyg*. 10 de janeiro de 2001;65(4):346–50.
86. Nucci M, Portugal R, Pulcheri W, Spector N, Ferreira SB, de Castro MB, et al. Strongyloidiasis in patients with hematologic malignancies. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. Setembro de 1995;21(3):675–7.
87. Anuradha R, Munisankar S, Dolla C, Kumaran P, Nutman TB, Babu S. Parasite Antigen-Specific Regulation of Th1, Th2, and Th17 Responses in *Strongyloides stercoralis* Infection. *J Immunol*. 9 de janeiro de 2015;195(5):2241–50.
88. Anuradha R, Munisankar S, Bhootra Y, Jagannathan J, Dolla C, Kumaran P, et al. Systemic Cytokine Profiles in *Strongyloides stercoralis* Infection and Alterations following Treatment. *Infect Immun*. 2 de janeiro de 2016;84(2):425–31.
89. Yoshida H, Hunter CA. The immunobiology of interleukin-27. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:417–43.
90. Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, Palmer BE, Bufler P, Dinarello CA. Interleukin 37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol*. Novembro de 2010;11(11):1014–22.
91. Onah DN, Nawa Y. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. *Korean J Parasitol*. Dezembro de 2000;38(4):209–36.
92. Allen JE, Sutherland TE. Host protective roles of type 2 immunity: Parasite killing and tissue repair, flip sides of the same coin. *Semin Immunol*. Agosto de 2014;26(4):329–40.
93. Padigel UM, Hess JA, Lee JJ, Lok JB, Nolan TJ, Schad GA, et al. Eosinophils act as antigen-presenting cells to induce immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. *J Infect Dis*. 15 de dezembro de 2007;196(12):1844–51.
94. Shin MH, Lee YA, Min D-Y. Eosinophil-Mediated Tissue Inflammatory Responses in Helminth Infection. *Korean J Parasitol*. Outubro de 2009;47(Suppl):S125–31.
95. Padigel UM, Lee JJ, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Eosinophils Can Function as Antigen-Presenting Cells To Induce Primary and Secondary Immune Responses to *Strongyloides stercoralis*. *Infect Immun*. 6 de janeiro de 2006;74(6):3232–8.
96. Repetto SA, Durán PA, Lasala MB, González-Cappa SM. High rate of strongyloidosis infection, out of endemic area, in patients with eosinophilia and without risk of exogenous reinfections. *Am J Trop Med Hyg*. 6 de janeiro de 2010;82(6):1088–93.
97. Lam CS, Tong MKH, Chan KM, Siu YP. Disseminated strongyloidiasis: a retrospective study of clinical course and outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 18 de janeiro de

- 2006;25(1):14–8.
98. Lagacé-Wiens PRS, Harding GKM. A Canadian immigrant with coinfection of *Strongyloides stercoralis* and human T-lymphotropic virus 1. *Can Med Assoc J.* 28 de agosto de 2007;177(5):451–3.
 99. Anuradha R, Munisankar S, Bhootra Y, Jagannathan J, Dolla C, Kumaran P, et al. IL-10- and TGFβ-mediated Th9 Responses in a Human Helminth Infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 5 de janeiro de 2016;10(1):e0004317.
 100. Kaplan MH. Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev.* Março de 2013;252(1):104–15.
 101. Kaplan MH, Hufford MM, Olson MR. The Development and *in vivo* function of TH9 cells. *Nat Rev Immunol.* Maio de 2015;15(5):295–307.
 102. Blankenhaus B, Klemm U, Eschbach M-L, Sparwasser T, Huehn J, Kühl AA, et al. *Strongyloides ratti* infection induces expansion of Foxp3+ regulatory T Cells that interfere with immune response and parasite clearance in BALB/c mice. *J Immunol.* 4 de janeiro de 2011;186(7):4295–305.
 103. Tattermusch S, Bangham CRM. HTLV-1 infection: what determines the risk of inflammatory disease? *Trends Microbiol.* Outubro de 2012;20(10):494–500.
 104. Ribeiro SR, Covre LP, Stringari LL, Zago-Gomes M da P, Gomes DCO, Pereira FEL. Peripheral blood CD4+/CD25+ regulatory T cells in alcoholic patients with *Strongyloides stercoralis* infection. *Parasitol Res.* 1º de março de 2017;116(3):1071–4.
 105. Blankenhaus B, Reitz M, Brenz Y, Eschbach M-L, Hartmann W, Haben I, et al. Foxp3+ regulatory T Cells delay expulsion of intestinal nematodes by suppression of IL-9-driven mast cell activation in BALB/c but not in C57BL/6 mice. *PLoS Pathog.* 6 de fevereiro de 2014;10(2).
 106. Wammes LJ, Hamid F, Wiria AE, Wibowo H, Sartono E, Maizels RM, et al. Regulatory T Cells in human lymphatic filariasis: stronger functional activity in microfilaremics. *PLoS Negl Trop Dis.* 29 de maio de 2012;6(5).
 107. Atkins, Conway, Lindo, Bailey, Bundy. L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlations with larval output. *Parasite Immunol.* 1º de outubro de 1999;21(10):517–26.
 108. Bosqui LR, Gonçalves ALR, Gonçalves-Pires M do RF, Custodio LA, de Menezes MCND, Murad VA, et al. 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.* Outubro de 2015;150:190–5.
 109. Rossi CL, Takahashi EEH, Partel CD, Teodoro LGVL, Silva LJ da. Total serum IgE and parasite: specific IgG and IgA antibodies in human strongyloidiasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* Agosto de 1993;35(4):361–5.
 110. Genta RM. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into the prevention of disseminated disease. *Rev Infect Dis.* Outubro de

- 1989;11(5):755–67.
111. Ribeiro VS, Feliciano ND, Gonzaga HT, Costa IN, Gonçalves-Pires MRF, Ueta MT, et al. Detergent fraction of heterologous antigen to detect IgA and IgG in strongyloidiasis using saliva and serum paired samples. *Immunol Lett.* 30 de novembro de 2010;134(1):69–74.
 112. Gonçalves ALR, Rocha CA, Gonzaga HT, Gonçalves-Pires M do R de F, 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.* Janeiro de 2012;72(1):79–84.
 113. Sato Y, Inoue F, Matsuyama R, Shiroma Y. Immunoblot analysis of antibodies in human strongyloidiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 6 de janeiro de 1990;84(3):403–6.
 114. Maruyama H, Yabu Y, Yoshida A, Nawa Y, Ohta N. A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. *J Immunol.* 4 de janeiro de 2000;164(7):3749–54.
 115. Dawicki W, Marshall JS. New and emerging roles for mast cells in host defence. *Curr Opin Immunol.* Fevereiro de 2007;19(1):31–8.
 116. Maruyama H, Osada Y, Yoshida A, Futakuchi M, Kawaguchi H, Zhang R, et al. Protective mechanisms against the intestinal nematode *Strongyloides venezuelensis* in *Schistosoma japonicum*-infected mice. *Parasite Immunol.* 1º de junho de 2000;22(6):279–86.
 117. Harnett W, Harnett MM. Helminth-derived immunomodulators: can understanding the worm produce the pill? *Nat Rev Immunol.* Abril de 2010;10(4):278–84.
 118. van Riet E, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. *Immunobiology.* 2007;212(6):475–90.
 119. Elliott DE, Weinstock JV. Where are we on worms? *Curr Opin Gastroenterol.* Novembro de 2012;28(6):551–6.
 120. Elliott DE, Weinstock JV. Helminthic therapy: using worms to treat immune-mediated disease. *Adv Exp Med Biol.* 2009;666:157–66.
 121. Finlay CM, Walsh KP, Mills KHG. Induction of regulatory cells by helminth parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases. *Immunol Rev.* Maio de 2014;259(1):206–30.
 122. Salgame P, Yap GS, Gause WC. Effect of helminth-induced immunity on infections with microbial pathogens. *Nat Immunol.* Novembro de 2013;14(11):1118–26.
 123. George PJ, Kumar NP, Sridhar R, Hanna LE, Nair D, Banurekha VV, et al. Coincident helminth infection modulates systemic inflammation and immune activation in active pulmonary tuberculosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 6 de novembro de 2014;8(11).
 124. George PJ, Kumar NP, Jaganathan J, Dolla C, Kumaran P, Nair D, et al. Modulation of

- pro- and anti - inflammatory cytokines in active and latent tuberculosis by coexistent *Strongyloides stercoralis* infection. Tuberc Edinb Scotl. Dezembro de 2015;95(6):822–8.
125. O’Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MPR. The immune response in tuberculosis. Annu Rev Immunol. 2013;31:475–527.
 126. Richter J, Müller-Stöver I, Strothmeyer H, Göbels K, Schmitt M, Häussinger D. Arthritis associated with *Strongyloides stercoralis* infection in HLA B-27-positive African. Parasitol Res. Novembro de 2006;99(6):706–7.
 127. Hsieh YP, Wen YK, Chen ML. Minimal change nephrotic syndrome in association with strongyloidiasis. Clin Nephrol. Dezembro de 2006;66(6):459–63.
 128. Atul S, Ajay D, Ritambhara N, Harsh M, Ashish B. An unusual cause of malabsorption in an immunocompetent host. J Ayub Med Coll Abbottabad JAMC. Março de 2005;17(1):85–6.
 129. Harish K, Sunilkumar R, Varghese T, Feroze M. Strongyloidiasis presenting as duodenal obstruction. Trop Gastroenterol Off J Dig Dis Found. Dezembro de 2005;26(4):201–2.
 130. Gulbas Z, Kebapci M, Pasaoglu O, Vardareli E. Successful ivermectin treatment of hepatic strongyloidiasis presenting with severe eosinophilia. South Med J. Setembro de 2004;97(9):907–10.
 131. Teixeira MCA, Inês EJ, Pacheco FTF, Silva RKNR, Mendes AV, Adorno EV, et al. Asymptomatic *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in an alcoholic patient with intense anemia. J Parasitol. Agosto de 2010;96(4):833–5.
 132. Ostera G, Blum J, Cornejo C, Burgula S, Jeun R, Bryan PE, et al. Strongyloidiasis in Latin American immigrants: a pilot study. J Helminthol. Março de 2017;91(2):262–6.
 133. Mejia R, Nutman TB. Screening, prevention, and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*. Curr Opin Infect Dis. Agosto de 2012;25(4):458–63.
 134. Marcos LA, Terashima A, Canales M, Gotuzzo E. Update on Strongyloidiasis in the Immunocompromised Host. Curr Infect Dis Rep. 1º de fevereiro de 2011;13(1):35–46.
 135. Weatherhead JE, Mejia R. Immune Response to Infection with *Strongyloides stercoralis* in Patients with Infection and Hyperinfection. Curr Trop Med Rep. 1º de dezembro de 2014;1(4):229–33.
 136. WHO. Global status report on alcohol and health. World Health Organization; 2014.
 137. PAHO. Regional Status Report on Alcohol and Health in the Americas. Pan American Health Organization; 2015.
 138. Haddad JJ. Alcoholism and neuro-immune-endocrine interactions: physiochemical aspects. Biochem Biophys Res Commun. Outubro de 2004;323(2):361–71.

139. Avendaño L, Hernandez F, Jimenez F, Avila A, Castro D. *Strongyloides stercoralis* en pacientes alcohólicos. *Parasitol Al Día*. Julho de 1999;23(3-4):91-4.
140. Adedayo O, Grell G, Bellot P. Hyperinfective strongyloidiasis in the medical ward: review of 27 cases in 5 years. *South Med J*. Julho de 2002;95(7):711-6.
141. Molina PE, Happel KI, Zhang P, Kolls JK, Nelson S. Focus On: Alcohol and the Immune System. *Alcohol Res Health*. 2010;33(1-2):97-108.
142. Wang HJ, Zakhari S, Jung MK. Alcohol, inflammation, and gut-liver-brain interactions in tissue damage and disease development. *World J Gastroenterol WJG*. 21 de março de 2010;16(11):1304-13.
143. Leclercq S, De Saeger C, Delzenne N, de Timary P, Stärkel P. Role of inflammatory pathways, blood mononuclear cells, and gut-derived bacterial products in alcohol dependence. *Biol Psychiatry*. 1º de novembro de 2014;76(9):725-33.
144. Lippai D, Bala S, Petrasek J, Csak T, Levin I, Kurt-Jones EA, et al. Alcohol-induced IL-1 β in the brain is mediated by NLRP3/ASC inflammasome activation that amplifies neuroinflammation. *J Leukoc Biol*. 7 de janeiro de 2013;94(1):171-82.
145. Domínguez-Santalla MJ, Vidal C, Viñuela J, Pérez LF, González-Quintela A. Increased serum IgE in alcoholics: relationship with Th1/Th2 cytokine production by stimulated blood mononuclear cells. *Alcohol Clin Exp Res*. 1º de agosto de 2001;25(8):1198-205.
146. González-Quintela A, Vidal C, Lojo S, Pérez LF, Otero-Antón E, Gude F, et al. Serum cytokines and increased total serum IgE in alcoholics. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol*. Julho de 1999;83(1):61-7.
147. Domínguez-Santalla MJ, Vidal C, Viñuela J, Pérez LF, González-Quintela A. Increased Serum IgE in Alcoholics: Relationship With Th1/Th2 Cytokine Production by Stimulated Blood Mononuclear Cells. *Alcohol Clin Exp Res*. 1º de agosto de 2001;25(8):1198-205.
148. Krolewiecki AJ, Leon S, Scott PA, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Effect of Chronic Ethanol Consumption on Protective T-Helper 1 and T-Helper 2 Immune Responses Against the Parasites *Leishmania major* and *Strongyloides stercoralis* in Mice. *Alcohol Clin Exp Res*. 1º de abril de 2001;25(4):571-8.
149. Jongwutiwes S, Charoenkorn M, Sitthichareonchai P, Akaraborvorn P, Putaporntip C. Increased sensitivity of routine laboratory detection of *Strongyloides stercoralis* and hookworm by agar-plate culture. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. Agosto de 1999;93(4):398-400.
150. Ericsson CD, Steffen R, Siddiqui AA, Berk SL. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* Infection. *Clin Infect Dis*. 10 de janeiro de 2001;33(7):1040-7.
151. VALLADA EP. Manual de Exames de Fezes – Coprologia e Parasitologia. São Paulo: Atheneu; 1993.
152. MORAES RG. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da strongyloidíase no Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1948;1:507-624.

153. Arakaki T, Hasegawa H, Asato R, Ikeshiro T, Kinjo F, Saito A, et al. A New Method to Detect *Strongyloides stercoralis* from Human Stool. *Jpn J Trop Med Hyg.* 1988;16(1):11–7.
154. Sudré AP, Macedo HW de, Peralta RHS, Peralta JM. Diagnóstico da estrogiloidíase humana: importância e técnicas. *Rev Patol Trop.* Dezembro de 2006;35(3):173–84.
155. Requena-Méndez A, Chiodini P, Bisoffi Z, Buonfrate D, Gotuzzo E, Muñoz J. The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(1):e2002.
156. Kishimoto K, Hokama A, Hirata T, Ihama Y, Nakamoto M, Kinjo N, et al. Endoscopic and histopathological study on the duodenum of *Strongyloides stercoralis* hyperinfection. *World J Gastroenterol WJG.* 21 de março de 2008;14(11):1768–73.
157. Cirioni O, Giacometti A, Burzacchini F, Balducci M, Scalise G. *Strongyloides stercoralis* first-stage larvae in the lungs of a patient with AIDS: primary localization or a noninvasive form of dissemination? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* Abril de 1996;22(4):737.
158. Dutcher JP, Marcus SL, Tanowitz HB, Wittner M, Fuks JZ, Wiernik PH. Disseminated strongyloidiasis with central nervous system involvement diagnosed antemortem in a patient with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitts lymphoma. *Cancer.* 1º de dezembro de 1990;66(11):2417–20.
159. Fowler CG, Lindsay I, Levin J, Sweny P, Fernando ON, Moorhead JF. Recurrent hyperinfestation with *Strongyloides stercoralis* in a renal allograft recipient. *Br Med J Clin Res Ed.* 13 de novembro de 1982;285(6352):1394.
160. Gordon SM, Gal AA, Solomon AR, Bryan JA. Disseminated strongyloidiasis with cutaneous manifestations in an immunocompromised host. *J Am Acad Dermatol.* agosto de 1994;31(2 Pt 1):255–9.
161. Boscolo M, Gobbo M, Mantovani W, Degani M, Anselmi M, Monteiro GB, et al. Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for strongyloidiasis as a tool for diagnosis and follow-up. *Clin Vaccine Immunol.* Fevereiro de 2007;14(2):129–33.
162. Silva LP, Barcelos IS da C, Passos-Lima AB, Espindola FS, Campos DMB, Costa-Cruz JM. Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Julho de 2003;98(5):687–91.
163. Toledo R, Muñoz-Antoli C, Esteban J-G. Chapter Five - Strongyloidiasis with Emphasis on Human Infections and Its Different Clinical Forms. In: Stothard DR. *Advances in Parasitology.* Academic Press; 2015. p. 165–241.
164. Buonfrate D, Formenti F, Perandin F, Bisoffi Z. Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin Microbiol Infect.* Junho de 2015;21(6):543–52.
165. Machado ER, Ueta MT, de Fátima Gonçalves-Pires MR, Oliveira JBA, Faccioli LH, Costa-Cruz JM. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*

- Setembro de 2003;98(6):849–51.
166. Rascoe LN, Price C, Shin SH, McAuliffe I, Priest JW, Handali S. Development of Ss-NIE-1 recombinant antigen based assays for immunodiagnosis of strongyloidiasis. *PLOS Negl Trop Dis*. 10 de abril de 2015;9(4):e0003694.
 167. Ravi V, Ramachandran S, Thompson RW, Andersen JF, Neva FA. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. *Mol Biochem Parasitol*. Novembro de 2002;125(1–2):73–81.
 168. Sudré AP, Siqueira RC, Barreto MGM, Peralta RHS, Macedo HW, Peralta JM. Identification of a 26-kDa protein fraction as an important antigen for application in the immunodiagnosis of strongyloidiasis. *Parasitol Res*. 14 de junho de 2007;101(4):1117–23.
 169. Moghaddassani H, Mirhendi H, Hosseini M, Rokni M, Mowlavi G, Kia E. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection by PCR detection of specific DNA in human stool samples. *Iran J Parasitol*. Junho de 2011;6(2):23–30.
 170. Watts MR, James G, Sultana Y, Ginn AN, Outhred AC, Kong F, et al. A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for *Strongyloides stercoralis* in stool that uses a visual detection method with SYTO-82 fluorescent dye. *Am J Trop Med Hyg*. 5 de fevereiro de 2014;90(2):306–11.
 171. Abdul-Ghani R, Al-Mekhlafi AM, Karanis P. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for malarial parasites of humans: would it come to clinical reality as a point-of-care test? *Acta Trop*. Junho de 2012;122(3):233–40.
 172. El-Badry AA. ELISA-based coproantigen in human strongyloidiasis: a diagnostic method correlating with worm burden. *J Egypt Soc Parasitol*. Dezembro de 2009;39(3):757–68.
 173. Sykes AM, McCarthy JS. A Coproantigen Diagnostic Test for *Strongyloides* Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 8 de fevereiro de 2011;5(2):e955.
 174. Costa-Cruz JM, Madalena J, Silva DA de O, Sopelete MC, Campos DMB, Taketomi EA. Heterologous antigen extract in ELISA for the detection of human IgE anti-*Strongyloides stercoralis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. Outubro de 2003;45(5):265–8.
 175. Mota-Ferreira DML, Gonçalves-Pires M do RF, Júnior AF, Sopelete MC, Abdallah VOS, Costa-Cruz JM. Specific IgA and IgG antibodies in paired serum and breast milk samples in human strongyloidiasis. *Acta Trop*. Fevereiro de 2009;109(2):103–7.
 176. Sultana Y, Gilbert GL, Ahmed B-N, Lee R. Strongyloidiasis in a high risk community of Dhaka, Bangladesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. Dezembro de 2012;106(12):756–62.
 177. Gann PH, Neva FA, Gam AA. A randomized trial of single- and two-dose ivermectin versus thiabendazole for treatment of strongyloidiasis. *J Infect Dis*. 5 de janeiro de 1994;169(5):1076–9.
 178. Zaha O, Hirata T, Kinjo F, Saito A, Fukuhara H. Efficacy of ivermectin for chronic

- strongyloidiasis: two single doses given 2 weeks apart. *J Infect Chemother*. 1º de março de 2002;8(1):94–8.
179. Zaha O, Hirata T, Uchima N, Kinjo F, Saito A. Comparison of anthelmintic effects of two doses of ivermectin on intestinal strongyloidiasis in patients negative or positive for anti-HTLV-1 antibody. *J Infect Chemother*. 1º de dezembro de 2004;10(6):348–51.
 180. Suputtamongkol Y, Premasathian N, Bhumimuang K, Waywa D, Nilganuwong S, Karuphong E, et al. Efficacy and safety of single and double doses of ivermectin versus 7-day high dose albendazole for chronic strongyloidiasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 10 de maio de 2011;5(5).
 181. Henriquez-Camacho C, Gotuzzo E, Echevarria J, White Jr AC, Terashima A, Samalvides F, et al. Ivermectin versus albendazole or thiabendazole for *Strongyloides stercoralis* infection. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd; 2016,
 182. Barrett J, Broderick C, Soulsby H, Wade P, Newsholme W. Subcutaneous ivermectin use in the treatment of severe *Strongyloides stercoralis* infection: two case reports and a discussion of the literature. *J Antimicrob Chemother*. 1º de janeiro de 2016;71(1):220–5.
 183. Grein JD, Mathisen GE, Donovan S, Fleckenstein L. Serum ivermectin levels after enteral and subcutaneous administration for *Strongyloides* hyperinfection: A case report. *Scand J Infect Dis*. 1º de janeiro de 2010;42(3):234–6.
 184. de Moura EB, Maia M de O, Ghazi M, Amorim FF, Pinhati HM. Salvage treatment of disseminated strongyloidiasis in an immunocompromised patient: therapy success with subcutaneous ivermectin. *Braz J Infect Dis*. Setembro de 2012;16(5):479–81.
 185. Shikiya K, Zaha O, Niimura S, Uehara T, Ohshiro J, Kinjo F, et al. [Clinical study on ivermectin against 125 strongyloidiasis patients]. *Kansenshogaku Zasshi*. Janeiro de 1994;68(1):13–20.
 186. Adenusi AA, Oke AO, Adenusi AO. Comparison of ivermectin and thiabendazole in the treatment of uncomplicated human *Strongyloides stercoralis* infection. *Afr J Biotechnol*. 27 de fevereiro de 2004;2(11):465–9.
 187. Datry A, Hilmarsdottir I, Mayorga-Sagastume R, Lyagoubi M, Gaxotte P, Biligui S, et al. Treatment of *Strongyloides stercoralis* infection with ivermectin compared with albendazole: results of an open study of 60 cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 5 de janeiro de 1994;88(3):344–5.
 188. Lindo JF, Robinson RD, Terry SI, Vogel P, Gam AA, Neva FA, et al. Age-prevalence and household clustering of *Strongyloides stercoralis* infection in Jamaica. *Parasitology*. Janeiro de 1995;110:97–102.
 189. Nutman TB. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. *Parasitology*. Março de 2017;144(3):263–73.
 190. Mendes T, Minori K, Ueta M, Miguel DC, Allegretti SM. Strongyloidiasis current status with emphasis in diagnosis and drug research. *J Parasitol Res*.

- 2017;2017:e5056314.
191. Silva MLS, Inês EJ, Souza JN, Souza ABS, Dias VMS, Oliveira LN, et al. Influence of parasite load on the diagnosis and occurrence of eosinophilia in alcoholic patients infected with *Strongyloides stercoralis*. J Helminthol. Novembro de 2017;1–5.
 192. de Souza JN, Inês EDJ, Santiago M, Teixeira MCA, Soares NM. *Strongyloides stercoralis* infection in patients with systemic lupus erythematosus: diagnosis and prevention of severe strongyloidiasis. Int J Rheum Dis. 1º de agosto de 2015;n/a-n/a.
 193. Bisoffi Z, Buonfrate D, Sequi M, Mejia R, Cimino RO, Krolewiecki AJ, et al. Diagnostic accuracy of five serologic tests for *Strongyloides stercoralis* infection. PLoS Negl Trop Dis. 9 de janeiro de 2014;8(1).
 194. Corral MA, Paula FM, Meisel DMCL, Castilho VLP, Gonçalves EMN, Levy D, et al. Potential immunological markers for diagnosis of human strongyloidiasis using heterologous antigens. Parasitology. Fevereiro de 2017;144(2):124–30.
 195. Carvalho EFG, Sousa JEN, Gonçalves ALR, da Cunha-Junior JP, Costa-Cruz JM. Immunoblotting using *Strongyloides venezuelensis* larvae, parthenogenetic females or eggs extracts for the diagnosis of experimentally infected immunosuppressed rats. Exp Parasitol. 1º de outubro de 2015;157(Supplement C):117–23.
 196. Rouhani S, Mahmoudi M. Identification of infective larva (L3) proteins of *Strongyloides stercoralis* by immunoblot. Arch Clin Infect Dis. 2010;5(2):101–5.
 197. Teixeira MCA, Pacheco FTF, Souza JN, Silva MLS, Inês EJ, et al. *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholic patients. BioMed Research International. 2016.
 198. Arifin N, Yunus MH, Nolan TJ, Lok JB, Noordin R. Identification and preliminary evaluation of a novel recombinant protein for serodiagnosis of strongyloidiasis. Am J Trop Med Hyg. 4 de abril de 2018;98(4):1165–70.
 199. Rugai E, Mattos T, Brisola AP. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes: modificação do método de Baermann. Rev Inst Adolfo Lutz. 1954;14:5–8.
 200. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 7 de maio de 1976;72(1):248–54.
 201. Ramanathan R, Burbelo PD, Groot S, Iadarola MJ, Neva FA, Nutman TB. A luciferase immunoprecipitation systems assay enhances the sensitivity and specificity of diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. J Infect Dis. 1º de agosto de 2008;198(3):444–51.
 202. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. P R J Public Health Trop Med. 1934;9(3).
 203. Koga K, Kasuya S, Khamboonruang C, Keturat S, Masatoshi I, Naoyoshi T, et al. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. Am J Trop Med Hyg. Outubro de 1991;45(4):518–21.

204. Conway DJ, Atkins NS, Lillywhite JE, Bailey JW, Robinson RD, Lindo JF, et al. Immunodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: a method for increasing the specificity of the indirect ELISA. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 4 de janeiro de 1993;87(2):173–6.
205. Corral MA, de Paula FM, Meisel DMCL, Abdala E, Figueiredo Costa S, Camera Pierrotti L, et al. IgG reactivity with 40-35 kDa soluble and membrane antigen of *Strongyloides venezuelensis* in immunocompromised patients. *Acta Trop.* 1º de fevereiro de 2019;190:357–60.
206. Zhan B, Ajmera R, Geiger SM, Gonçalves MTP, Liu Z, Wei J, et al. Identification of immunodominant antigens for the laboratory diagnosis of toxocaríasis. *Trop Med Int Health.* 1º de dezembro de 2015;20(12):1787–96.
207. Rodpai R, Intapan PM, Thanchomnang T, Sanpool O, Janwan P, Laummaunwai P, et al. *Strongyloides stercoralis* diagnostic polypeptides for human strongyloidiasis and their proteomic analysis. *Parasitol Res.* Outubro de 2016;115(10):4007–12.
208. Vargas P, Krolewiecki AJ, Echazú A, Juárez M, Cajal P, Gil JF, et al. Serologic monitoring of public health interventions against *Strongyloides stercoralis*. *Am J Trop Med Hyg.* 12 de julho de 2017;97(1):166–72.
209. Buonfrate D, Sequi M, Mejia R, Cimino RO, Krolewiecki AJ, Albonico M, et al. Accuracy of five serologic tests for the follow up of *Strongyloides stercoralis* Infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 10 de fevereiro de 2015;9(2):e0003491.
210. Mounsey K, Kearns T, Rampton M, Llewellyn S, King M, Holt D, et al. Use of dried blood spots to define antibody response to the *Strongyloides stercoralis* recombinant antigen NIE. *Acta Trop.* 1º de outubro de 2014;138(Supplement C):78–82.
211. Concha R, Harrington W, Rogers AI. Intestinal strongyloidiasis: recognition, management, and determinants of outcome. *J Clin Gastroenterol.* Março de 2005;39(3):203–11.
212. Addolorato G, Capristo E, Gasbarrini G, Stefanini GF. Depression, alcohol abuse and oro-caecal transit time. *Gut.* 9 de janeiro de 1997;41(3):417–417.
213. Wegener M, Schaffstein J, Dilger U, Coenen C, Wedmann B, Schmidt G. Gastrointestinal transit of solid-liquid meal in chronic alcoholics. *Dig Dis Sci.* Julho de 1991;36(7):917–23.
214. Cunha RA, de Carvalho EFG, de Sousa JEN, Costa-Cruz JM. Excretory/secretory antigens of *Strongyloides venezuelensis* applied to IgG detection in human strongyloidiasis. *Parasitol Int.* 1º de outubro de 2017;66(5):671–6.
215. Corral MA, Paula FM, Gottardi M, Meisel DMCL, Chieffi PP, Gryscek RCB, et al. Membrane fractions from *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* Fevereiro de 2015;57(1):77–80.
216. Feliciano ND, Gonzaga HT, Gonçalves-Pires M do RF, Gonçalves ALR, Rodrigues RM, Ueta MT, et al. Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Junho de

- 2010;67(2):153–61.
217. Atkins NS, Conway DJ, Lindo JF, Bailey JW, Bundy DA. L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlations with larval output. *Parasite Immunol.* Outubro de 1999;21(10):517–26.
 218. Abdul-Fattah MM, Nasr ME, Yousef SM, Ibraheem MI, Abdul-Wahhab SE, Soliman HM. Efficacy of ELISA in diagnosis of strongyloidiasis among the immune-compromised patients. *J Egypt Soc Parasitol.* Agosto de 1995;25(2):491–8.
 219. Bosqui LR, Gonzaga HT, Gonçalves-Pires M do R de F, de Paula FM, Almeida RS, Pavanelli WR, et al. Avidity as a criterion for diagnosis of human strongyloidiasis increases specificity of IgG ELISA. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1º de dezembro de 2017;89(4):262–4.
 220. Kearns TM, Currie BJ, Cheng AC, McCarthy J, Carapetis JR, Holt DC, et al. *Strongyloides* seroprevalence before and after an ivermectin mass drug administration in a remote Australian Aboriginal community. *PLoS Negl Trop Dis.* 15 de maio de 2017;11(5):e0005607.
 221. Schur PH. IgG subclasses. A historical perspective. *Monogr Allergy.* 1988;23:1–11.
 222. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG Subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 20 de outubro de 2014;5.
 223. Teixeira MCA, Pacheco FTF, Souza JN, Silva MLS, Inês EJ, Soares NM. *Strongyloides stercoralis* Infection in Alcoholic Patients. *BioMed Research International.* 2016.
 224. Lomholt FK, Nielsen SF, Nordestgaard BG. High alcohol consumption causes high IgE levels but not high risk of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 1º de novembro de 2016;138(5):1404-1413.e13.
 225. Pasala S, Barr T, Messaoudi I. Impact of Alcohol Abuse on the Adaptive Immune System. *Alcohol Res Curr Rev.* 2015;37(2):185–97.

ANEXO A: Influence of parasite load on the diagnosis and occurrence of eosinophilia in alcoholic patients infected with *Strongyloides stercoralis*

Mônica Lopes Sampaio Silva¹, Elizabete de Jesus Inês¹, **Joelma Nascimento de Souza¹**, Alex Bruno da Silva Souza¹, Victória Maria dos Santos Dias¹, Luana Neves de Oliveira¹, Cléa Medeiros Guimarães², Edimacia Reis Menezes², Larissa Gomes Barbosa², Maria Del Carmen Moleiro Alves², Márcia Cristina Aquino Teixeira¹ e Neci Matos Soares¹

¹ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

² Obras Sociais Irmã Dulce, Salvador, Bahia, Brazil

Research Paper

Cite this article: Silva M.L.S. *et al.* (2019). Influence of parasite load on the diagnosis and occurrence of eosinophilia in alcoholic patients infected with *Strongyloides stercoralis*. *Journal of Helminthology* 93, 21–25. <https://doi.org/10.1017/S0022149X17001110>

Received: 12 July 2017

Accepted: 30 October 2017

First published online: 28 November 2017

Author for correspondence:

N.M. Soares, Fax: +55 71 32836939, E-mail: necsoares@gmail.com

Influence of parasite load on the diagnosis and occurrence of eosinophilia in alcoholic patients infected with *Strongyloides stercoralis*

M.L.S. Silva¹, E.J. Inês¹, J.N. Souza¹, A.B.S. Souza¹, V.M.S. Dias¹, L.N. Oliveira¹, C.M. Guimarães², E.R. Menezes², L.G. Barbosa², M.C.M. Alves², M.C.A. Teixeira¹ and N.M. Soares¹

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil and ²Obras Sociais Irmã Dulce, Salvador, Bahia, Brazil

Abstract

Alcoholic patients are more susceptible to *Strongyloides stercoralis* infection. The chronic use of alcohol raises the levels of endogenous corticosteroids, which regulates the development of larvae and stimulates the differentiation of rhabditiform into infective filariform larvae, thus inducing internal autoinfection. Therefore, early diagnosis is important to prevent severe strongyloidiasis. The aim of this study was to evaluate the efficacy of parasitological methods, according to the parasite load and the number of stool samples, for diagnosis of *S. stercoralis* infection, as well the peripheral blood eosinophil count in alcoholic patients. A total of 330 patients were included in this study. The diagnosis was established using three parasitological methods: agar plate culture, Baermann–Moraes method and spontaneous sedimentation. Peripheral eosinophilia was considered when the level was >600 eosinophils/mm³. The agar plate culture (APC) had the highest sensitivity (97.3%). However, the analysis of multiple samples increased the sensitivity of all parasitological methods. The sensitivities of the methods were influenced by the parasite load. When the larval number was above 10, the sensitivity of APC was 100%, while in spontaneous sedimentation the sensitivity reached 100% when the larval number was above 50. In the present study, 15.4% of alcoholic patients infected with *S. stercoralis* (12/78) had increased peripheral blood eosinophil count (above 600 eosinophils/mm³). For an efficient parasitological diagnosis of *S. stercoralis* infection in alcoholic patients, repeated examination by two parasitological methods must be recommended, including agar plate culture due to its higher sensitivity. Moreover, *S. stercoralis* infection was associated with eosinophilia, mostly in patients excreting up to 10 larvae/g faeces.

Introduction

Strongyloides stercoralis infection affects between 10 and 40% of the population in many tropical and subtropical countries (Schär *et al.*, 2013). In Brazil, the prevalence of strongyloidiasis can vary according to different populations, regions and diagnostic methods evaluated (de Paula *et al.*, 2000). The prevalence of *S. stercoralis* infection in alcoholic patients in Salvador, Brazil, was 23.5% (Silva *et al.*, 2016). Strongyloidiasis is considered to be a neglected tropical disease and is probably underdiagnosed, due to its irregular parasitic load and uncertain clinical symptoms (Puthiyakunnon *et al.*, 2014). The parasite's capacity to cause autoinfection is responsible for the decade-long persistence of infection in untreated hosts (de Souza *et al.*, 2014; Puthiyakunnon *et al.*, 2014) and facilitates the transmission of the disease, mainly in areas without adequate sanitation.

In clinical laboratories, the detection of larvae in stool samples is performed as a definitive diagnostic test. However, due to an irregular and small larval load in the faeces in the majority of patients with chronic infection, repeated stool examinations associated with different parasitological methods are necessary to establish an accurate diagnosis of *Strongyloides* infection (Dreyer *et al.*, 1996; Uparanukraw *et al.*, 1999; de Souza *et al.*, 2016). The parasitological methods that have been used include direct faecal smear, Baermann–Moraes method, spontaneous sedimentation, TF-Test*, formalin–ether concentration, filter-paper culture and agar plate culture (APC) (Arakaki *et al.*, 1990; Kobayashi *et al.*, 1996; Ericsson *et al.*, 2001). Agar plate culture, although rarely used, is the parasitological method that has the highest sensitivity for *S. stercoralis* diagnosis (Koga *et al.*, 1992; de Kaminsky, 1993; Blatt & Cantos, 2003; Inês *et al.*, 2011). Moreover, the identification of parasites based on the different patterns of larval movement in APC, may increase the sensitivity of the method when larvae are not recovered from cultures, and may also reduce the risk of contamination (Inês *et al.*, 2011). Eosinophilia has been considered a potential marker in screening for chronic strongyloidiasis, particularly in asymptomatic individuals (Nutman *et al.*, 1987; Gill & Bailey, 1989). In addition, eosinophils

perform an important role in host defence; they are not only directly involved in the innate immune response, but also in the adaptive immune response against helminth larvae (Padigel et al., 2006; Shin et al., 2009; Trieman et al., 2010).

Chronic alcohol use has been associated with *S. stercoralis* infection (Oliveira et al., 2002; Marques et al., 2010) and a higher predisposition to hyperinfection and severe strongyloidiasis (Lashof et al., 2007; Teixeira et al., 2010). A reliable diagnosis is particularly important for alcoholic patients and other groups at risk of severe *S. stercoralis* infection. In the present study, we evaluated the efficacy of three different parasitological methods and number of stool samples for *S. stercoralis* diagnosis, as well as the presence of peripheral eosinophils in alcoholic patients according to the parasite load.

Materials and methods

Patients and parasitological diagnosis

The present study was carried out from September 2012 to March 2014 in alcoholic patients seen at a public hospital in Salvador, Bahia, Brazil, which is supported by the National Health System. The diagnosis of chronic alcoholism was according to WHO criteria (F10.2, ICD 10, 2002). All alcoholic patients provided detailed information on daily alcohol intake and they were hospitalized voluntarily for treatment of alcoholism.

Initially, 330 patients were enrolled in this study. Informed consent for participation was obtained from each patient during delivery of clinical specimens. A total of 328 individuals delivered three faecal samples, which were examined by three different methods – spontaneous sedimentation, Baermann–Moraes method and agar plate culture (APC) – at the Clinical and Toxicological Laboratory of the College of Pharmacy at the Federal University of Bahia, Brazil. Two patients provided only one faecal sample and they were excluded from evaluation of the efficacy of parasitological methods. The sensitivities of each method were calculated according to the number of stool samples analysed and the parasite load. Larvae from approximately 1 g of faeces, obtained by the Baermann–Moraes method, were quantified under a microscope (at 400 \times magnification). The peripheral blood eosinophil count was measured in 330 alcoholic patients and eosinophilia was considered when the eosinophil count was greater than 600 cells/mm³.

Statistic analysis

Statistical analyses were performed using the statistical software GraphPad (San Diego, California, USA). The cumulative number of positive samples, and the comparison of efficacies of parasitological methods and frequency of eosinophilia according parasite load were performed using the chi-square test. Differences were considered to be statistically significant when $P < 0.05$.

The Kappa test was used to measure the concordance between the parasitological methods. The reference values are inferred as follows: <0, no agreement; 0–0.19, poor; 0.20–0.39, low; 0.40–0.59, moderate; 0.60–0.79, substantial and 0.80–1.00, excellent agreement (Landis & Koch, 1977).

Results

Efficacy of parasitological methods

APC was the most sensitive parasitological method for the detection of *S. stercoralis* larvae (97.3%), when considering the results

of three samples on alternate days, followed by the Baermann–Moraes and sedimentation methods, with a sensitivity of 87.8% and 77%, respectively. APC increased the number of *S. stercoralis*-positive samples detected, compared to Baermann–Moraes and spontaneous sedimentation methods, diagnosing an additional 7 and 15 cases, respectively (table 1). There was a statistically significant difference between the *Strongyloides* diagnosis performed by APC and spontaneous sedimentation methods ($P < 0.05$). The analysis of two or three samples by APC increased larval detection by 10 (13.5%) and 12 (16.2%) additional cases, respectively, when compared to a single sample ($P < 0.05$). The analysis of multiple samples increased the sensitivity of all three parasitological methods (table 1).

In this study, the three parasitological methods showed a high level of agreement ($K > 0.8$): APC with Baermann–Moraes ($K = 0.899$), APC with sedimentation ($K = 0.837$) and Baermann–Moraes with sedimentation ($K = 0.859$).

The sensitivities of the methods were influenced by the parasite load. In APC, the sensitivity reached 100% when the larval number was above 10, while spontaneous sedimentation reached 100% only when there were more than 50 larvae. The spontaneous sedimentation had the lowest sensitivity for the recovery of *S. stercoralis* larvae in positive stool samples having up to 10 larvae/g faeces (26/42; 61.9%) (table 2).

The majority of alcoholic patients positive for *S. stercoralis* (42/74) presented within 10 larvae/g faeces (56.8%), nine of these patients (21.4%) were negative by the Baermann–Moraes method and were diagnosed by APC (9/9) and spontaneous sedimentation (3/9). Twenty-three per cent of alcoholic patients had a parasite load of 11–50 larvae/g faeces and 17.6% (13) with 51–500 larvae/g faeces (table 2). Two hyperinfected patients (2.7%) were diagnosed with more than 1000 larvae/g faeces (table 2).

Eosinophil levels in alcoholic patients

In the present study, 15.4% of alcoholic patients infected with *S. stercoralis* (12/78) had >600 eosinophils/mm³, while 5.2% of uninfected patients (13/252) had eosinophilia ($P < 0.05$). There was a significant difference between the mean eosinophil count in alcoholic patients infected (343/mm³ of blood) and those uninfected (247/mm³) with *S. stercoralis* ($P < 0.05$). Most of the *S. stercoralis*-infected patients who presented with an eosinophil count above 600/mm³ of blood had within 10 larvae/g faeces (83.3%; 10/12) and two hyperinfected patients presented a normal eosinophil count, below 600/mm³ (table 3).

Table 1. A comparison of three parasitological methods for *Strongyloides stercoralis* diagnosis according to the cumulative number of samples ($n = 74$).

Number of samples	Sensitivity of methods (%)		
	Spontaneous sedimentation	Baermann–Moraes	APC ^a
1	62.3% (46)	70.3% (52)	81.1% (60)
2	74.3% (55)	83.8% (62)	94.6% (70) ^b
3	77.0% (57)	87.8% (65) ^c	97.3% (72) ^d

^aComparison between the sensitivity of the Baermann–Moraes method with one and three stool samples ($P < 0.05$). ^bComparison between the sensitivities of the APC with one and two or three samples ($P < 0.05$). ^cComparison of APC with spontaneous sedimentation to detect *S. stercoralis* larvae was statistically significant ($P < 0.05$), independent of the number of samples.

Table 2. Number of positive samples for *S. stercoralis* larvae by different parasitological methods, according to the parasite load (n = 74).

Parasite load*	Number of positive samples (%)			Total
	Spontaneous sedimentation	Baermann-Moraes	APC	
Non-measurable	3 (33.3)	0 (0)	9 (100)**	9
1–10	23 (69.7)	33 (100)	31 (93.9)**	33
11–50	16 (94.1)	17 (100)	17 (100)	17
51–100	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4
101–500	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9
>500	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2
Total	57 (100)	65 (100)	72 (100)	74

*Number of parasite/g faeces by the Baermann-Moraes method. **The APC method was more sensitive than the Baermann-Moraes and the spontaneous sedimentation method (non-measurable larval number/Baermann-Moraes negative result) and the spontaneous sedimentation method (1–10 larval output/g faeces) (Fisher's test; $P < 0.05$).

Discussion

Some studies in Brazil have indicated a high prevalence of *S. stercoralis* infection in alcoholic patients (Oliveira et al., 2002; Marques et al., 2010), despite the use of diagnostic methods having low sensitivity. In this study, the agar plate culture method was the most sensitive (97.3%) for detection of *S. stercoralis* larvae, when compared to both Baermann-Moraes (87.8%) and spontaneous sedimentation methods (77.0%). This confirms the results of a previous study undertaken in our laboratory (Inês et al., 2011) and other studies (Arakaki et al., 1990; Koga et al., 1992; de Kaminsky, 1998; Blatt & Cantos, 2003). In addition, in the present study, the sensitivity of the parasitological methods tested changed according to the number of larvae excreted in faeces. APC had the highest sensitivity in patients excreting a low number of larvae – up to 10 parasites/g faeces (low parasite load) – when compared with both Baermann-Moraes and spontaneous sedimentation methods. In the normal routine of a clinical laboratory, the APC method is not commonly used, despite its high efficacy for *S. stercoralis* diagnosis (Inês et al., 2011).

However, in infections with a parasite load greater than 10 larvae/g, the Baermann-Moraes method achieved a 100% sensitivity rate, as in the APC method. The sensitivity of the three parasitological methods reached 100% when there was high parasite load (above 50 larvae/g faeces). Other studies have also demonstrated

increased parasitological sensitivity according the number of larvae identified in faeces (Intapan et al., 2005; Schär et al., 2004).

As the number of larvae increases in the faeces of alcoholic *S. stercoralis*-infected patients, the easier it is to establish the diagnosis (Silva et al., 2016), and even methods with low sensitivity, such as spontaneous sedimentation, can detect the presence of larvae. The high parasite load in alcoholic patients is probably due the increase of endogenous corticosteroid levels, due to excessive alcohol consumption, which in turn enhances the fecundity of parasite females and the transformation of rhabditiform into infective filariform larvae, mimicking the effect of worm ecdysteroids and leading to internal autoinfection (Corcha et al., 2005). Consequently, alcoholic patients are more susceptible to the development of hyperinfection and severe strongyloidiasis (Lashof et al., 2007). Besides, the chronic consumption of alcohol has a toxic effect on the smooth muscle contractile proteins of the small intestine, reducing gastrointestinal peristalsis and enhancing the risk of autoinfection (Wiegner et al., 1990; Addolorato et al., 1997). The poor hygienic habits of alcoholic patients may also increase the risk of infection with soil-transmitted helminths.

The sensitivity of all parasitological methods increased according to the number of faecal samples examined. However, none of these methods achieved 100% sensitivity, which emphasizes the need for the use of different methods and repeated sample analysis. These findings are in agreement with the results obtained in other studies (Upasamaksuw et al., 1999; Hirata et al., 2007; Steinmann et al., 2007; Knopp et al., 2008). In the absence of a 'gold standard' method for the *S. stercoralis* diagnosis, the use of agar plate culture, due to its high sensitivity, associated with the Baermann-Moraes method is the most suitable approach, since none of the samples was diagnosed using the spontaneous sedimentation method alone. Although laborious and time consuming, APC is more efficient than other parasitological diagnostic methods for detection of larvae in stool samples (Sato et al., 1995; Jongwutives et al., 1999; Inês et al., 2011).

Eosinophilia is a common finding in patients chronically infected with *S. stercoralis* and may aid in the diagnosis. However, it is often absent in hyperinfection and disseminated disease in patients under immunosuppressive therapy (Genta et al., 1986; Newberry et al., 2005). Alcohol consumption has been shown to be associated with immune suppression and immune modulation (Teixeira et al., 2016). Conversely, case reports showed increased eosinophilia in alcoholic patients with hyperinfection syndrome caused by *S. stercoralis* (Teixeira et al.,

Table 3. Eosinophilia in *S. stercoralis*-infected (n = 70) and in uninfected alcoholic patients (n = 252) according to parasite load.

Parasite load*	Eosinophilia**		Total
	Present n (%)	Absent n (%)	
Negative	13 (5)**	239 (95)	252
Non-measurable	1 (5)	10 (91)	11
1–10	9 (45)**	26 (74)	35
11–50	1 (5)	16 (94)	17
51–100	0 (0)	4 (100)	4
101–500	1 (11)	8 (89)	9
>500	0 (0)	2 (100)	2

*Number of parasite/g faeces by the Baermann-Moraes method. **>400 eosinophils/mm³ of blood. *Significant occurrence of eosinophilia in *S. stercoralis*-infected patients with low parasite load, compared to non-infected patients ($P < 0.05$, chi-square test).

2010; Zaidi et al., 2011). Our data revealed eosinophilia in 15.4% (12/78) of *S. stercoralis*-infected patients. However, an increased number of eosinophils was mostly observed (83.3%; 10/12) in infected patients excreting fewer than 10 larvae/g faeces. These results suggest that high parasite load may affect the production of eosinophils in alcoholic patients, which is probably due to the immune modulation of the host response induced by *S. stercoralis* infection, as all patients were alcoholics. Moreover, it is important to stress that the absence of eosinophilia should not be used to infer the absence of *Strongyloides* infection.

In conclusion, our data pointed out the need to obtain more than one faecal sample and to use several parasitological methods, including agar plate culture, for *S. stercoralis* diagnosis. Eosinophilia may guide the clinical suspicion of strongyloidiasis in alcoholic patients, but it may be absent in patients with high parasite loads.

Financial support. This work was supported by Ministério da Saúde/Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPES/BAPISES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazilian agencies.

Conflict of interest. None.

Ethical standards. This study was approved by the Committee of Ethics in Research of the Nursing School, Federal University of Bahia, Brazil.

References

Addolorato G, Caprioto E, Gasbarrini G and Stefanini GF (1997) Depression, alcohol abuse and orocaecal transit time. *Gut* 41, 417–418.

Araújo T, Isonaga M, Kinjo F, Saito A, Asato R and Iwashiro T (1990) Efficacy of agar-plate culture in detection of *Strongyloides stercoralis* infection. *Journal of Parasitology* 78, 425–428.

Blatt JM and Cantow GA (2003) Evaluation of techniques for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in human immunodeficiency virus (HIV) positive and HIV negative individuals in the city of Itajaí, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 7, 402–408.

Canche R, Harrington W and Rogers AI (2005) Intestinal strongyloidiasis: recognition, management, and determinants of outcome. *Journal of Clinical Gastroenterology* 39, 203–211.

de Kaminsky RG (1993) Evaluation of three methods for laboratory diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Journal of Parasitology* 79, 277–280.

de Paula FM, de Castro E, Gonçalves-Pires MD, Marçal MD, Campos DM and Costa-Cruz JM (2000) Parasitological and immunological diagnosis of strongyloidiasis in immunocompetent and non-immunocompetent children at Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 42, 51–55.

de Souza JN, Iroh ED, Santiago M, Teixeira MCA and Sousa NM (2016) *Strongyloides stercoralis* infection in patients with systemic lupus erythematosus: diagnosis and prevention of severe strongyloidiasis. *International Journal of Rheumatic Diseases* 19, 700–705.

de Souza JN, Machado PR, Teixeira MC and Sousa NM (2014) Recurrence of *Strongyloides stercoralis* infection in a patient with Hansen's disease: a case report. *Leprosy Review* 85, 58–62.

Dwyer G, Fernandes-Silva E, Alves S, Rocha A, Albuquerque R and Addisu D (1996) Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: implications for diagnosis and clinical trials. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 2569–2571.

Brisson CD, Steffen R, Siddiqui AA and Berk SL (2001) Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clinical Infectious Diseases* 33, 1040–1047.

Genta RM, Doum RW and Walker PD (1986) Diagnostic implications of parasite-specific immune responses in immunocompromised patients with strongyloidiasis. *Journal of Clinical Microbiology* 23, 1099–1103.

Gill GV and Bailey JW (1989) Eosinophilia as a marker for chronic strongyloidiasis – use of a serum ELISA test to detect asymptomatic cases. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 83, 249–252.

Hinata T, Nakamura H, Kinjo N, Hokama A, Kinjo F, Yamane N and Fujita J (2007) Increased detection rate of *Strongyloides stercoralis* by repeated stool examinations using the agar plate culture method. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 683–684.

Iroh E de J, Souza JN, Santos RC, Souza ES, Santos FL, Silva M.L.S., Silva MF, Teixeira MCA and Sousa NM (2011) Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. *Acta Tropica* 120, 206–210.

Intapan PM, Makroong W, Wongsooj T, Singthong S and Monkote N (2005) Comparison of the quantitative formalin ethyl acetate concentration technique and agar plate culture for diagnosis of human strongyloidiasis. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 1932–1933.

Irimawan NC, Sanyoto AO, Oyibo WA and Fughero-Beylides AP (2010) *Strongyloides stercoralis* and the immune response. *Parasitology International* 59, 9–14.

Jongsutives S, Cham-onkom M, Sitthicharanachai P, Akarabornvor P and Putapornit C (1999) Increased sensitivity of routine laboratory detection of *Strongyloides stercoralis* and hookworm by agar-plate culture. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 93, 398–400.

Kropp S, Mohammed KA, Striba Khamsi I, Mgenti AP, Stothard JR, Rollinson D, Marti H and Utzinger J (2008) Spatial distribution of soil-transmitted helminths, including *Strongyloides stercoralis*, among children in Zanzibar. *Geospatial Health* 3, 47–56.

Kobayashi J, Hasegawa H, Souza EC, Tama H, Dacal C, De AR, Brito MC, Yamazaki A, Feli AA and Sato Y (1996) Studies on prevalence of *Strongyloides* infection in Holambra and Mocimó, Brazil, by the agar plate faecal culture method. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 38, 279–284.

Koga KK, Kusyo S and Ohtsuno H (1992) How effective is the agar plate method for *Strongyloides stercoralis*? *Journal of Parasitology* 78, 155–156.

Landis JR and Koch GG (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159–174.

Luoh AO, Lusterhaus WJ, Wauten G, Becken P and Keuter M (2007) Colitis in an alcohol-dependent woman. *The Lancet* 369, 2050.

Marques CC, Zagó-Gomes M da P, Gonçalves CS and Pereira FR (2010) Alcoholism and *Strongyloides stercoralis* daily ethanol ingestion has a positive correlation with the frequency of *Strongyloides* larvae in the stool. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4, e717. doi:10.1371/journal.pntd.000717

Newberry AM, Williams DN, Stauffer WM, Bonham DR, Handel-Paterson BR and Walker PF (2005) *Strongyloides* hyperinfection presenting as acute respiratory failure and gram-negative sepsis. *Chest* 128, 3681–3684.

Nitman TB, Ottosen EA, Long S, Samsook J, Kimball E, Lukoki M, Zandi WS, Gam A and Nava FA (1987) Eosinophilia in Southeast Asian refugees: evaluation at a referral center. *Journal of Infectious Diseases* 155, 309–313.

Oliveira ICM de, Ribeiro CT, Mendes D de M, Oliveira TC and Costa-Cruz JM (2002) Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 119–121.

Radigel UM, Lee JJ, Nolan TJ, Schud GA and Abraham D (2006) Eosinophilia can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*. *Infection and Immunity* 74, 3232–3238.

Pathipakamon S, Bodda S, Li Y, Zhou X, Wang C, Li J and Chen X (2014) Strongyloidiasis – an insight into its global prevalence and management. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8, e2018. doi:10.1371/journal.pntd.0003018

Sato Y, Kobayashi J and Shimono Y (1995) Serodiagnosis of strongyloidiasis. The application and significance. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 37, 35–41.

Schär F, Trötschel U, Gardina F, Khien V, Muth S, Marti H, Voornstein P and Odermatt P (2015) *Strongyloides stercoralis*: global distribution and risk factors. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7, e2288. doi:10.1371/journal.pntd.0002288

Schär F, Hattendorf J, Khien V, Muth S, Char M, Marti H and Odermatt P (2014) *Strongyloides stercoralis* larvae excretion patterns before and after treatment. *Parasitology* 141, 892–897.

- Shin MH, Lee YA and Min DY (2009) Eosinophil-mediated tissue inflammatory responses in helminth infection. *Korean Journal of Parasitology* 47, S125–S131.
- Silva ML, Iida E de J, Sousa AB, Dias VM, Guimarães CM, Menezes ER, Barbosa LG, Alves M del C, Teixeira MC and Sousa NM (2016) Association between *Strongyloides stercoralis* infection and cortisol secretion in alcoholic patients. *Acta Tropica* 154, 133–138.
- Steinmann P, Zhou X-N, Du Z-W, Jiang J-Y, Wang L-B, Wang X-Z, Li L-H, Mariti H and Utzinger J (2007) Occurrence of *Strongyloides stercoralis* in Yunnan Province, China, and comparison of diagnostic methods. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 1, e75. doi:10.1371/journal.pntd.0000075
- Teixeira MCA, Iida E, Pacheco FTF, Silva RKNR, Mendes AV, Adorno EV, Lima IM and Sousa NM (2010) Asymptomatic *Strongyloides stercoralis* hypereinfestation in an alcoholic patient with intense anemia. *Journal of Parasitology* 96, 833–835.
- Teixeira MCA, Pacheco FTF, Sousa JN, Silva MLS, Iida E and Sousa NM (2016) *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholic patients. *BioMed Research International* 2016, 4872473. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4872473>
- Upamankar P, Phongsri S and Morakote N (1999) Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60, 967–973.
- Wegener M, Schaffstein J, Dölger U, Goeman C, Weidmann B and Schmidt G (1991) Gastrointestinal transit of solid-liquid meal in chronic alcoholics. *Digestive Diseases and Sciences* 36, 917–923.
- Zaidi A, Natanajan N and Sharma VR (2011) Eosinophilia as a marker of *Strongyloides* infection. *Blood* 118, 4932.

ANEXO B: Alterations in serum paraoxonase-1 activity and lipid profile in chronic alcoholic patients infected with *Strongyloides stercoralis*

Elizabete de Jesus Inês^a, Mônica Lopes Sampaio Silva^a, **Joelma Nascimento de Souza^a**,
Alana Alcântara Galvão^b, Márcia Cristina Aquino Teixeira^a, Neci Matos Soares^a

^aDepartamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia,
Salvador, Bahia, Brazil

^bLaboratório de Alergia e Acarologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador,
Bahia, Brazil



Alterations in serum paraoxonase-1 activity and lipid profile in chronic alcoholic patients infected with *Strongyloides stercoralis*



Elizabete de Jesus Inês^a, Mônica Lopes Sampaio Silva^a, Joelma Nascimento de Souza^a, Alana Alcântara Galvão^b, Márcia Cristina Aquino Teixeira^a, Neci Matos Soares^{a,*}

^a Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

^b Laboratório de Alergia e Acarologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 July 2016

Received in revised form 8 October 2016

Accepted 18 October 2016

Available online 19 October 2016

Keywords:

Alcoholism
Paraoxonase;
Cortisol
S. stercoralis
Serum lipids

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate paraoxonase-1 (PON1) activity, cortisol levels, and the lipid profile in the sera of alcoholic and non-alcoholic *Strongyloides stercoralis*-infected and uninfected individuals in a sample of 276 individuals attended at the National Health System in Salvador, Bahia, Brazil. The activity of PON1 was measured by the Beltowski method, serum lipids, and cortisol levels using commercial kits. PON1 activity was low in both alcoholic and non-alcoholic individuals infected with *S. stercoralis*. A positive correlation was observed between PON1 activity and cortisol concentration in alcoholic individuals who were not infected with *S. stercoralis*; whereas a negative correlation occurred in *S. stercoralis*-infected nonalcoholic individuals. The levels of triglycerides, LDL-C, and VLDL-C in *S. stercoralis*-infected alcoholic individuals were significantly lower than in uninfected alcoholic individuals. The high level of HDL-C and the low level of LDL-C, VLDL, triglycerides and PON1 activity in alcoholic patients infected with *S. stercoralis* evidenced an anti-atherogenic pattern.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The paraoxonase (PON) gene family includes three members, *PON1*, *PON2* and *PON3*, aligned in tandem on the long arms of chromosomes (q21Æ22). Serum PON1 is predominantly synthesized by hepatocytes and released into the circulation associated with high-density lipoproteins (HDL). It is involved in a multitude of biological activities, including the detoxification of organophosphate and the prevention of atherosclerosis. As well, it presumably protects low-density lipoproteins (LDL) against oxidative stress, reducing the formation of macrophage foam cells and inactivate LDL-derived oxidized phospholipids (Costa et al., 2005; Shih et al., 1998).

PON1 activity has been implicated in the pathogenesis of other inflammatory diseases caused by bacteria, viruses, parasites, and excessive alcohol consumption (Akbas et al., 2010; Aviram et al., 1999; Farid et al., 2008; Marsillach et al., 2007). Farid et al. (2009) studying Wistar rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*, observed marked decreases in serum PON1 activity and increased pro-inflammatory cytokines in serum (IL-1, IL-6 and TNF-

α). A moderate consumption of alcohol is associated with slight increases in serum PON1 activity and HDL cholesterol (HDL-C) in normal subjects (Hendriks et al., 1998; Rao et al., 2003; Sierksma et al., 2002; van der Gaag et al., 1999). However, in chronic alcoholics with liver cirrhosis, the PON1 activity and HDL-C is very low (Kedage et al., 2010; Marsillach et al., 2007; Rao et al., 2003; Sabesin et al., 1977).

A high parasite load *S. stercoralis* infection has been associated with alcoholism (Silva et al., 2016). Possibly, this is due to the effect of ethanol on the hypothalamic pituitary adrenal axis, increasing the levels of endogenous corticosteroids, leading to larvae differentiation from rhabditoid to filariform infective stage and hyperinfection (Choudhry et al., 2006; László et al., 2001; Ogilvie et al., 1998; Teixeira et al., 2010). Moreover, some studies have demonstrated lipid profile alterations in other parasitic infections (Bansal et al., 2005; Soares et al., 2010). A decrease in total cholesterol, triglycerides, and HDL-C was observed in *Callithrix jacchus* (sagui) infected with *Schistosoma mansoni* (de Ramos et al., 2004) and in guinea pigs infected with *Ascaris suum* (Biaduñ, 1989). Others studies with intestinal worms have shown decreased serum lipid levels (in hookworm and *Trichuris* infected patients) with a significant inverse correlation between worm egg excretion and HDL-C levels (Bansal et al., 2005; Wiedermann et al., 1991).

* Corresponding author at: Rua Barão de Jeremoabo, s/n Campus Universitário de Ondina, Ondina, 40170 115, Salvador, Bahia, Brazil.

E-mail addresses: farmliza@yahoo.com.br (E. de Jesus Inês), necisoares@gmail.com, neci@ufba.br (N.M. Soares).

The purpose of this study was to investigate PON1 activity, cortisol levels, and lipid profile in *Strongyloides stercoralis*-infected and uninfected alcoholic and non-alcoholic individuals.

2. Materials and methods

2.1. Patients and sample details

The present study was performed from September 2012 to March 2014. A total of 276 individuals, who were attended at the National Health System in Salvador, Bahia, Brazil, were included in this study. All of the subjects included in this study lived in emerging neighborhoods, and presented similar demographic and socioeconomic characteristics. Samples of venous blood were collected from patients after fasting for 12 h; a total of 202 alcoholics (71 *S. stercoralis*-infected and 131 uninfected individuals) and from 74 non-alcoholics (13 *S. stercoralis*-infected and 61 uninfected individuals). The chronic alcoholic individuals were voluntarily hospitalized for alcoholism treatment (mean age of 43.9 ± 9.7), diagnosed according to WHO criteria (F10.2, ICD 10, 2002) and the non-alcoholic individuals, apparently healthy, were attended at an outpatient service (mean age of 47.0 ± 13.7). The inclusion criteria were the following: adult males with fecal examination and information on the occurrence, or not, of daily ethanol intake. None of the subjects had used corticosteroids or any other immunosuppressive drugs nor were infected with HIV, HTLV-1 or hepatic virus. The Committee of Ethics in Research of the Nursing School, Federal University of Bahia, Brazil, approved this study and a written informed consent for participation was assigned from each patient, when the clinical specimens were acquired.

2.2. Strongyloidiasis diagnosis

Three fresh fecal samples from each subject were examined on alternate days by three different parasitological methods: spontaneous sedimentation, modified Baermann-Moraes, and agar plate culture (APC). *S. stercoralis* larvae from one gram of feces obtained by the modified Baermann-Moraes method were quantified under a microscope (400 \times magnification).

2.2.1. Quantification of PON1 activity

All sera samples were stored at -80°C until measurement of the PON1 activity. Serum PON1 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) basal activity was assayed according to Beltowski et al. (2005) method with some modifications. Briefly, serum PON1 activity was determined by measuring the initial rate of substrate hydrolysis to *p*-nitrophenol by absorbance at 405 nm. The assay mixture contained 5 mM paraoxon (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 2 mM CaCl_2 , and 7 μL of serum in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). The production of *p*-nitrophenol was detected after 5 min in a spectrophotometer (Biotek EL-800, CA, USA). Enzyme activity was measured at 25°C in duplicate and all results were presented in nmol per minute per mL, calculated from the E405 of *p*-nitrophenol ($18,050 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and expressed in U/mL (1 U of enzyme hydrolysis being equivalent to 1 nmol of paraoxon/min).

2.2.2. Serum cortisol levels

The serum cortisol level was measured by ELISA, in accordance with the manufacturer's instructions (Cortisol AccuBind™ EIA, Monobind Inc., USA). The blood samples were collected in the morning between 7:00 and 9:30 a.m.

2.3. Lipid profile and hepatic biomarkers

The measurement of HDL cholesterol and triglycerides levels was performed by enzymatic methods using commercial kits

(Roche Diagnostics; Mannheim, Germany and Pureauto S TG-N; Daiichi Pure Chemicals, Tokyo, Japan, respectively). The serum LDL cholesterol (LDL-C) concentration was estimated using the Friedewald formula (Friedewald et al., 1972). Serum alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, γ -glutamyltransferase, and bilirubin concentrations were measured by standard methods (Beckman-Coulter Fullerton, CA, USA).

2.4. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the statistical software Graph Pad 5.0 (San Diego, USA). The paraoxonase activity cut-off value was established by the ROC curve (receiver operating characteristic) using 29 serum samples from healthy adult individuals and 59 serum samples from *S. stercoralis*-infected patients with normal ALT and AST levels. Fisher's exact test was performed for comparison between cortisol levels and paraoxonase among alcoholic and non-alcoholic individuals, and calculated with 95% confidence intervals. The Spearman correlation test was used to correlate the cortisol levels with PON1 activity in all patient groups. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. The univariate regression analysis was performed to relate *S. stercoralis* infection and alcoholism. Linear regression analysis was used to verify the correlation between paraoxonase activity and larvae load and paraoxonase activity with *S. stercoralis* and other parasites coinfection.

3. Results

The PON1 activity was significantly lower in *S. stercoralis*-infected patients (both alcoholic and non-alcoholic) than in alcoholic and non-alcoholic uninfected individuals ($p < 0.05$, Table 1). Among the infected patients, the PON1 activity was lower in non-alcoholic than in alcoholic patients ($p < 0.05$).

Parasite load was quantified in 63 infected patients, those in which the Baerman-Moraes was positive. Of these, 82.5% (52/63) had low parasitic load (range to 1 from 100 larvae/g of feces) and 17.5% (11/63) had high parasite load (range to 101 from 1000 larvae/g of feces). From the patients with low parasitic load, 63.5% (33/52) had paraoxonase activity $< 100 \text{ U/ml}$ and 36.5% (19/52) had paraoxonase activity $> 100 \text{ U/ml}$. The most of patients with high parasite load, 72.7% (8/11), had paraoxonase activity $< 100 \text{ U/ml}$. No statically differences were observed between parasite load and PON1 activity ($p > 0.05$; linear regression). From the 71 patients with *S. stercoralis* infection, 23.9% (17/71) were coinfecting with other parasites. *S. mansoni* coinfection was observed in 14.1% (10/71), *A. lumbricoides* in 2.8% (2/71), hookworm in 9.9% (7/71), *T. trichiura* in 5.6% (4/71), *Giardia duodenalis* in 2.8% (2/71), *E. nana* in 4.2% (3/71), *E. coli* in 5.6% (4/71) and *E. histolytica/dispar* in 1.4% (1/71) patients. However, analyses by linear regression showed that coinfection had not effect on PON1 activity ($p < 0.05$).

The cortisol level was higher in alcoholic individuals than in non-alcoholic individuals regardless of being infected or not ($p > 0.05$, Table 1). As shown in Fig. 1, serum PON1 activity had a weak positive correlation with cortisol levels in uninfected alcoholic patients (A, $r = 0.248$, $p < 0.05$). However, there was no correlations between serum PON1 activity and cortisol levels in infected alcoholic patients (B, $r = -0.01$, $p > 0.05$). Moreover, serum PON1 activity in non-alcoholic *S. stercoralis* infected patients had negative correlation with cortisol levels (C, $r = -0.602$, $p < 0.05$). A correlation of PON1 activity with sera cortisol levels in uninfected non-alcoholic individuals was not observed (D, $r = -0.11$, $p > 0.05$).

The triglycerides, LDL-C, and VLDL levels were lower in *S. stercoralis*-infected patients than in uninfected alcoholic patients ($p < 0.05$; Table 1). On the other hand, total cholesterol and LDL-C

Table 1Activity of paraoxonase (PON1), cortisol levels and lipid profile in serum of alcoholic and nonalcoholic *S. stercoralis*-infected and uninfected individuals.

Parameter	Alcoholics (n=202)		p	Non-alcoholics (n=74)		p
	Infected (n=71) X±SE	Uninfected (n=131) X±SE		Infected (n=13) X±SE	Uninfected (n=61) X±SE	
PON1 activity U/ml.	74.60±6.44****	107.9±5.50	<0.05	18.7±8.74****	118.9±13.91	<0.05
Cortisol (µg/dL)	28.2±0.76 [#]	26.3±0.78 [#]	NS	13.74±2.32 [#]	13.10±1.13 [#]	NS
TC (mg/dL)	181.5±4.71	194.9±3.71 [§]	NS	207.3±10.29	180.5±4.66 [§]	<0.05
HDL-C (mg/dL)	62.98±2.78*	60.49±1.83 [§]	NS	47.92±3.54*	45.97±2.25 [§]	NS
LDL-C (mg/dL)	98.96±3.75**	110.3±2.99	<0.05	131.7±9.75**	108.2±3.67	<0.05
VLDL-C (mg/dL)	18.08±1.04	22.96±1.04	<0.05	25.24±3.858	24.75±2.09	NS
TG (mg/dL)	90.32±5.16***	114.7±5.19	<0.05	145.3±26.01***	128.0±11.12	NS
Cr (mg/dL)	0.76±0.02*	0.80±0.02 ^{§§}	NS	0.95±0.03*	0.89±0.02 ^{§§}	NS
ALT (U/L)	50.00±5.17	46.13±4.15 [‡]	NS	33.33±6.02	30.12±2.75 [‡]	NS
AST (U/L)	98.18±9.82 ^{¶¶}	81.13±6.62 ^{‡‡}	NS	21.67±1.27 ^{¶¶}	25.60±2.16 ^{‡‡}	NS
GGT (U/L)	224.3±26.37 ^{¶¶¶}	245.8±23.92 ^{‡‡‡}	NS	36.55±6.98 ^{¶¶¶}	37.60±3.52 ^{‡‡‡}	NS
BT (mg/dL)	0.79±0.05	0.76±0.04	NS	0.9000±0.0	0.9000±0.17	NS
BD (mg/dL)	0.39±0.02	0.38±0.02	NS	0.3000±0.0	0.3143±0.0	NS
BI (mg/dL)	0.40±0.03	0.38±0.024	NS	0.6000±0.0	0.49±0.05	NS

Abbreviations: PON1 activity: Paraoxonase activity, TC: Total cholesterol, HDL-C: High density lipoprotein-cholesterol, LDL-C: Low density lipoprotein cholesterol, VLDL-C: very low-density lipoprotein; TG: triglyceride, Cr: Creatinine, ALT: Alanin amino transferase, AST: Aspartate amino transferase GGT: Gamma-glutamyl transferase, BT: Total bilirubin, BD: direct bilirubin, BI: indirect bilirubin, NS: non-significant, $p < 0.05$ statistically significant, values are expressed as mean ± standard deviation. [#] n^{total} – Differences statistically significant between alcoholic and non-alcoholic *S. stercoralis*-infected or uninfected individuals.

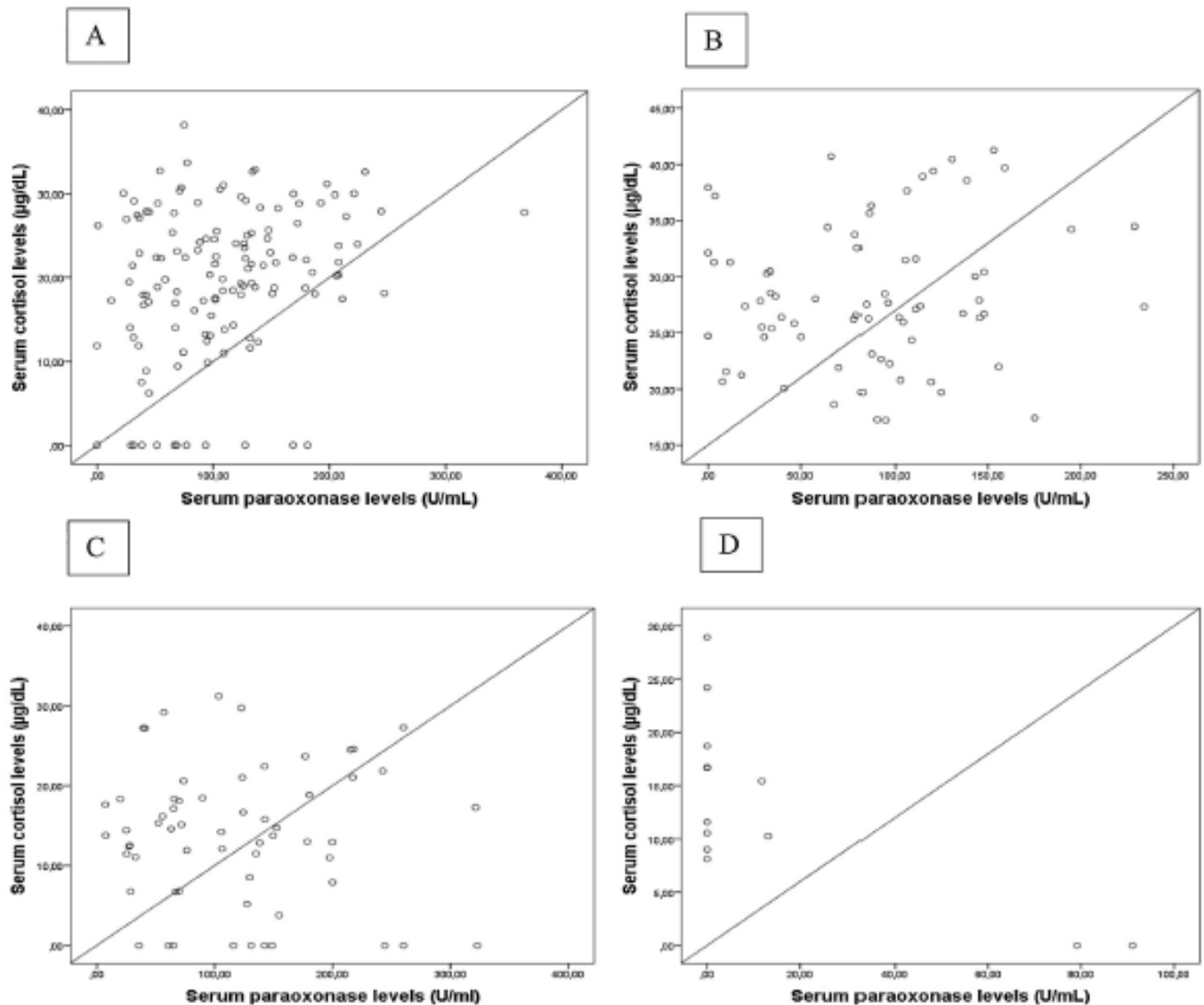


Fig. 1. Correlations between serum cortisol levels and paraoxonase activity: (A) alcoholic patients *S. stercoralis* uninfected ($r = 0.258$, $p < 0.05$) and (B) infected ($r = -0.125$, $p > 0.05$); (C) non-alcoholic *S. stercoralis* uninfected ($r = -0.010$, $p > 0.05$) and (D) infected patients ($r = -0.601$, $p < 0.05$).

were higher in *S. stercoralis*-infected than in uninfected non-alcoholic individuals ($p < 0.05$; Table 1). As shown in Table 1, HDL-C levels in alcoholic patients were higher than in non-alcoholic individuals (Table 1, $p < 0.05$), regardless of being infected or not infected ($p > 0.05$).

In those *S. stercoralis*-infected patients, the liver enzyme levels were higher in alcoholics than in non-alcoholics ($p < 0.05$). There were no significant differences in liver enzyme levels among the other groups of individuals included in this study (Table 1).

Analysis by binary logistic regression, using paraoxonase as outcome and alcoholism and *S. stercoralis* infection as a confounding variable showed a positive association between *S. stercoralis* infection and low paraoxonase activity (OR = 2.24; 95% CI = 1.29–3.89). Alcoholism was associated with low paraoxonase activity (crude OR = 0.90; 95% CI = 0.52–1.56) and a positive association with high HDL-C concentration (OR 2.31; 95% CI = 1.14–4.70; $p < 0.05$). No significant association was found between PON1 and HDL-C (OR 0.90; 95% CI = 0.45–1.81; $p > 0.05$).

4. Discussion

PON1 plays an important role in an organism's antioxidant and anti-inflammatory system. It is synthesized by the liver and circulates in the blood and is bound to high-density lipoprotein. The PON1 activity and serum HDL-C of individuals with moderate alcohol consumption increase while in chronic alcoholism they decrease (Sierksma et al., 2002; van der Gaag et al., 2001, 1999).

Our results showed that the PON1 activity was significantly lower in *S. stercoralis*-infected patients, regardless of whether they were or were not alcoholics. This is in agreement with other studies in which a decrease in PON1 activity was observed in rats infected with *N. brasiliensis* or *T. spiralis* (Farid et al., 2008; Mido et al., 2012). Analysis by binary logistic regression, using paraoxonase as outcome and alcoholism and *S. stercoralis* infection as a confounding variable showed a positive association between *S. stercoralis* infection and paraoxonase activity. Infection is a risk factor in determining low paraoxonase activity (OR = 2.24; 95% CI = 1.29–3.89). However, low paraoxonase activity was not associated with alcoholism (crude OR = 0.90; 95% CI = 0.52–1.56), probably because the alcoholic patients did not yet present altered hepatic function, since the hepatic enzyme levels were only slightly higher than the reference values. This was in agreement with other reports (Ferré et al., 2003; Vincent-Viry et al., 2003). The mechanisms underlying the observed PON1-activity reduction in parasite infection are not completely understood. The inflammatory process and toxic irritation of the gut wall may stimulate inflammatory cytokine production that would reduce both PON1 synthesis and PON1 activity.

Plasma lipid alterations have been demonstrated in some parasitic diseases. Patients with mansonic schistosomiasis have decreased total cholesterol and triglyceride levels (de Ramos et al., 2004). In human visceral leishmaniasis, high levels of triglycerides and low levels of HDL-C were shown (Soares et al., 2010). *Trichinella spiralis* infection increased LDL/VLDL and decreased HDL-C (Mido et al., 2012). As shown in this study, an increase in total cholesterol and LDL-C in non-alcoholic individuals infected with *S. stercoralis* was observed. This could be caused by pro-inflammatory cytokines released from activated immune cells (neutrophils and macrophages) that would induce high levels of serum LDL-C via increased activity of hepatic hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, which, in turn, leads to an increase in hepatic cholesterol synthesis and secretion and thus facilitates hepatic lipoprotein secretion (Feingold et al., 1995). On the other hand, the HDL-C levels and PON1 activity, both variables associated to anti-inflammatory mechanisms were higher in alcoholic infected than in non-alcoholic infected patients.

HDL-C levels were not changed by parasite infection inside the alcoholic and non-alcoholic groups. However, alcoholic patients had high levels of HDL-C, and a positive association between alcoholism and HDL-C (OR 2.31; 95% CI = 1.14–4.70; $p < 0.05$) was observed; similar to other studies with patients without hepatic damage (Marsillach et al., 2007; Sierksma et al., 2002). Alcohol intake increases HDL-C in a dose-dependent fashion, possibly because of an increase in the transport rate of HDL apolipoproteins apo A-I and A-II (Silva et al., 2000). On the other hand, Wu and Cederbaum (2003) have shown that a high dose of ethanol is a powerful generator of the free oxygen radicals that induce an increase in lipid peroxidation by two mechanisms; increasing the production of reactive oxygen species and/or decreasing endogenous antioxidant. This, in turn, could result in production of pro-inflammatory cytokines and induce a negative effect on HDL-C and PON1 activity (Farid et al., 2009, 2008).

In this study, no significant association was found between PON1 and HDL-C (OR 0.90; 95% CI = 0.45–1.81; $p > 0.05$). Although the metabolism of these two molecules has been related, factors resulting from immune-inflammatory, metabolic, vascular, neural and endocrine responses may influence the serum concentration of HDL-C and/or PON1 activity (Rossi et al., 2014; van der Gaag et al., 2001). Some studies on parasite infections also demonstrated the lack of association between HDL-C concentration and PON1 activity. This may be due to a defective HDL-C function, which is intimately associated with alterations in intravascular HDL-C metabolism and structure forming HDL particles with attenuated antioxidant activity (Kontush and Chapman, 2006; McNeil et al., 2002).

In the study described herein, high cortisol levels in alcoholic patients were observed in accordance with previous reports (Gianoulakis et al., 2003; Thayer et al., 2006). The production of endogenous cortisol was stimulated by the direct acute effect of alcohol on the HPA axis that altered endocrine function (Badrick et al., 2008; Ogilvie et al., 1998). To our knowledge, this is the first time that a positive correlation between paraoxonase activity and cortisol concentration in alcoholic patients has been shown. This could be ascribed to alcoholism having raised HDL synthesis and HDL-associated PON1. HDL is the major source of cholesterol for steroid synthesis and the absence of HDL-associated PON1 results in low HDL binding to adrenal cells and decreased accumulation of cholesterol ester, which is the precursor of corticosteroid (Gamliel-Lazarovich et al., 2010). Contrasting with the findings described above, a negative correlation between PON1 activity and serum cortisol level was shown in nonalcoholic *S. stercoralis*-infected patients. This may explain why PON1 activity was inhibited by parasite infection.

Farid et al. (2008), demonstrated a positive correlation between PON1 activity and parasite load in Wistar rats infected with *N. brasiliensis*. This was not observed in this study with alcoholic or non-alcoholic *S. stercoralis*-infected patients. Perhaps this was because of the different species of parasites and hosts.

A reduced PON1 activity has been observed in a number of pathological conditions. In alcoholic patients it occurs with the increase of inflammatory cytokines (Crews et al., 2006). The decrease of serum PON1 activity in *S. stercoralis* infection observed herein may be due to down-regulation of hepatic PON1 synthesis by pro-inflammatory cytokines, as demonstrated during *N. brasiliensis* infection in rats, (Farid et al., 2008) which is associated with an early and strong gut-inflammatory response with production of the cytokines IL-1, IL-6, and TNF- α (Khovichunkit et al., 2000; McGee et al., 1995). Moreover, free radical activity present in *S. stercoralis* infection (Shintoku et al., 2011) may decrease PON1 activity, as occurs in HIV infected patients (Parra et al., 2007).

A Spanish cohort study has concluded that alcohol intake in men aged 29–69 years was associated with a more than 30% lower coro-

nary heart disease incidence (Arriola et al., 2010). The best available hypothesis relates the protection against atherosclerosis to the increased concentration of HDL-C (Li and Mukamal, 2004). It has been demonstrated in this study that *S. stercoralis* infection significantly reduced serum paraoxonase activity more in non-alcoholic than in alcoholic patients. In addition, the lipid profile of *S. stercoralis* infected patients was changed and, apparently, the synergism between *S. stercoralis* infection and alcoholism maintained high HDL-C, low LDL-C, low VLDL, and low triglyceride concentrations and PON1 activity approximately four times higher than in nonalcoholic infected patients as in an anti-atherogenic profile. Therefore, more research is necessary to elucidate the effect of chronic nematode infections on changes in PON1 activity, the lipid profile, and the complex interplay of these factors in alcoholic patients infected with *S. stercoralis*.

Acknowledgements

This study was supported by Ministério da Saúde/Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (PPSUS/FAPESB). We wish to thank Dr. Lain Carlos Pontes-de-Carvalho for linguistic improvement on this manuscript.

References

- Akbas, H.S., Basyigit, S., Suleymanlar, I., Kemaloglu, D., Koc, S., Davran, F., Demir, I., Suleymanlar, G., 2010. The assessment of carotid intima media thickness and serum Paraoxonase-1 activity in *Helicobacter pylori* positive subjects. *Lipids Health Dis.* 9, 92, <http://dx.doi.org/10.1186/1476-511X-9-92>.
- Arriola, L., Martinez-Cambor, P., Larrañaga, N., Basterretxea, M., Amiano, P., Moreno-Iribas, C., Carracedo, R., Agudo, A., Ardanaz, E., Barricarte, A., Buckland, G., Cirera, L., Chirilaque, M.D., Martinez, C., Molina, E., Navarro, C., Quirós, J.R., Rodriguez, L., Sanchez, M.J., Tormo, M.J., González, C.A., Dorronsoro, M., 2010. Alcohol intake and the risk of coronary heart disease in the Spanish EPIC cohort study. *Heart Br. Card. Soc.* 96, 124–130, <http://dx.doi.org/10.1136/hrt.2009.173419>.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Billelke, S., Erogul, J., Sorenson, R., Bisgaier, C.L., Newton, R.S., La Du, B., 1999. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 892–904, [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00272-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00272-X).
- Badrick, E., Bobak, M., Britton, A., Kirschbaum, C., Marmot, M., Kumari, M., 2008. The relationship between alcohol consumption and cortisol secretion in an aging cohort. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 750–757, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2007-0737>.
- Bansal, D., Bhatti, H.S., Sehgal, R., 2005. Role of cholesterol in parasitic infections. *Lipids Health Dis.* 4, 10, <http://dx.doi.org/10.1186/1476-511X-4-10>.
- Beltowski, J., Jamroz-Wiśniewska, A., Borkowska, E., Wójcicka, G., 2005. Differential effect of antioxidant treatment on plasma and tissue paraoxonase activity in hyperleptinemic rats. *Pharmacol. Res.* 51, 523–532.
- Biaduń, W., 1989. Studies of serum lipids in guinea pigs with larval ascariasis. *Wiad. Parazytol.* 36, 15–26.
- Choudhry, M.A., Li, X., Chaudry, I.H., 2006. A role for corticosterone in impaired intestinal immunity and barrier function in a rodent model of acute alcohol intoxication and burn injury. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 1, 428–434, <http://dx.doi.org/10.1007/s11481-006-9031-5>.
- Costa, L.G., Vitalone, A., Cole, T.B., Furlong, C.E., 2005. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem. Pharmacol.* 69, 541–550, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2004.08.027>.
- Crews, F.T., Bechara, R., Brown, L.A., Guidot, D.M., Mandrekar, P., Oak, S., Qin, L., Szabo, G., Wheeler, M., Zou, J., 2006. Cytokines and alcohol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 30, 720–730, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00084.x>.
- Farid, A.S., Nakahara, K., Murakami, N., Hayashi, T., Horii, Y., 2008. Decreased serum paraoxonase-1 activity during intestinal nematode (*Nippostrongylus brasiliensis*) infection in rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 770–776.
- Farid, A.S., Shimohira, T., Kobayashi, I., Sawada, J., Horii, Y., 2009. Intestinally implanted *Nippostrongylus brasiliensis* adult worms decrease serum paraoxonase-1 activity in rats. *Parasitol. Int.* 58, 178–183, <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2009.03.001>.
- Feingold, K.R., Pollock, A.S., Moser, A.H., Shigenaga, J.K., Grunfeld, C., 1995. Discordant regulation of proteins of cholesterol metabolism during the acute phase response. *J. Lipid Res.* 36, 1474–1482.
- Ferré, N., Camps, J., Fernández-Ballart, J., Arijia, V., Murphy, M.M., Ceruelo, S., Biarnés, E., Vilella, E., Tous, M., Joven, J., 2003. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic nutritional, and lifestyle factors in the general population. *Clin. Chem.* 49, 1491–1497, <http://dx.doi.org/10.1373/jlab.1491>.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S., 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18, 499–502.
- Gamliel-Lazarovich, A., Gantman, A., Shiner, M., Coleman, R., Aviram, M., Keidar, S., 2010. Paraoxonase 1 deficiency in mice is associated with reduced steroid biosynthesis: effects on HDL binding, cholesterol ester accumulation and scavenger receptor type II expression. *Atherosclerosis* 211, 130–135, <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.01.045>.
- Gianoulakis, C., Dai, X., Brown, T., 2003. Effect of chronic alcohol consumption on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and pituitary β -endorphin as a function of alcohol intake, age, and gender. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 27, 410–423, <http://dx.doi.org/10.1097/01.ALC.0000056614.96137.B8>.
- Hendriks, H.F.J., Veenstra, J., Tol, A.V., Groener, J.E.M., Schaafsma, G., 1998. Moderate doses of alcoholic beverages with dinner and postprandial high density lipoprotein composition. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22, 403–410.
- Kedage, V., Muttigi, M.S., Shetty, M.S., Suvarna, R., Rao, S.S., Joshi, C., Prakash, M., 2010. Serum paraoxonase 1 activity status in patients with liver disorders. *Saudi J. Gastroenterol. Off. J. Saudi Gastroenterol. Assoc.* 16, 79–83, <http://dx.doi.org/10.4103/1319-3767.61232>.
- Khovidhunkit, W., Memon, R.A., Feingold, K.R., Grunfeld, C., 2000. Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. *J. Infect. Dis.* 181, S462–S472, <http://dx.doi.org/10.1086/315611>.
- Kontush, A., Chapman, M.J., 2006. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol. Rev.* 58, 342–374, <http://dx.doi.org/10.1124/pr.58.3.1>.
- László, F.A., Varga, C., Pívó, I., Gardi, J., Vecsernyés, M., Gálfi, M., Morschl, Á., László, F., Makara, G.B., 2001. Vasopressin receptor-mediated activation of HPA axis by acute ethanol stress in rats. *Am. J. Physiol. – Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R458–R465.
- Li, J.M., Mukamal, K.J., 2004. An update on alcohol and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 15, 673–680.
- Marsillach, J., Ferré, N., Vila, M.C., Lligoña, A., Mackness, B., Mackness, M., Deulofeu, R., Solá, R., Parés, A., Pedro-Botet, J., Joven, J., Caballeria, J., Camps, J., 2007. Serum paraoxonase-1 in chronic alcoholics: relationship with liver disease. *Clin. Biochem.* 40, 645–650, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.01.020>.
- McGee, D.W., Bamberg, T., Vitkus, S.J., McGhee, J.R., 1995. A synergistic relationship between TNF- α IL-1 β , and TGF- β 1 on IL-6 secretion by the IEC-6 intestinal epithelial cell line. *Immunology* 86, 6–11.
- McNeil, K.S., Knox, D.P., Proudfoot, L., 2002. Anti-inflammatory responses and oxidative stress in *Nippostrongylus brasiliensis*-induced pulmonary inflammation. *Parasite Immunol.* 24, 15–22, <http://dx.doi.org/10.1046/j.0141-9838.2001.00428.x>.
- Mido, S., Fath, E.M., Farid, A.S., Nonaka, N., Oku, Y., Horii, Y., 2012. Trichinella spiralis: infection changes serum paraoxonase-1 levels, lipid profile, and oxidative status in rats. *Exp. Parasitol.* 131, 190–194, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.03.023>.
- Ogilvie, K., Lee, S., Weiss, B., Rivier, C., 1998. Mechanisms mediating the influence of alcohol on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to immune and nonimmune signals. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22, 243S–247S, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1530-0277.1998.tb04010.x>.
- Parra, S., Alonso-Villaverde, C., Coll, B., Ferré, N., Marsillach, J., Aragonès, G., Mackness, M., Mackness, B., Masana, L., Joven, J., Camps, J., 2007. Serum paraoxonase-1 activity and concentration are influenced by human immunodeficiency virus infection. *Atherosclerosis* 194, 175–181, <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.07.024>.
- Rao, M.N., Marmillot, P., Gong, M., Palmer, D.A., Seeff, L.B., Strader, D.B., Lakshman, M.R., 2003. Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans. *Metabolism* 52, 1287–1294, [http://dx.doi.org/10.1016/S0026-0495\(03\)00191-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0026-0495(03)00191-4).
- Rossi, G., Kuleš, J., Rafaj, R.B., Mrljak, V., Lauzi, S., Giordano, A., Paltrinieri, S., 2014. Relationship between paraoxonase 1 activity and high density lipoprotein concentration during naturally occurring babesiosis in dogs. *Res. Vet. Sci.* 97, 318–324, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.07.010>.
- Sabesin, S., Hawkins, H., Kuiken, K., Ragland, J., 1977. Abnormal plasma lipoproteins and lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 72, 510–518.
- Shih, D.M., Gu, L., Xia, Y.-R., Navab, M., Li, W.-F., Hama, S., Castellani, L.W., Furlong, C.E., Costa, L.G., Fogelman, A.M., Lusis, A.J., 1998. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 394, 284–287, <http://dx.doi.org/10.1038/28406>.
- Shintoku, Y., Takagi, H., Kadosaka, T., Nagaoka, F., Kondo, S., Itoh, M., Honda, S., Kimura, E., 2011. *Strongyloides ratti*: transplantation of adults recovered from the small intestine at different days after infection into the colon of naive and infection-primed Wistar rats, and the effect of antioxidant treatment on large intestinal parasitism. *Parasitology* 138, 1053–1060, <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182011000631>.
- Sierksma, A., van der Gaag, M.S., van Tol, A., James, R.W., Hendriks, H.F.J., 2002. Kinetics of HDL cholesterol and paraoxonase activity in moderate alcohol consumers. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 26, 1430–1435, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1530-0277.2002.tb02688.x>.
- Silva, E.R.D.O.E., Foster, D., Harper, M.M., Seidman, C.E., Smith, J.D., Breslow, J.L., Brinton, E.A., 2000. Alcohol consumption raises HDL cholesterol levels by increasing the transport rate of apolipoproteins A-I and A-II. *Circulation* 102, 2347–2352, <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.102.19.2347>.
- Silva, M.L.S., Inês, E.de J., Souza, A.B., Dias, V.M., Guimarães, C.M., Menezes, E.R., Barbosa, L.G., Alves, M.del C., Teixeira, M.C.A., Soares, N.M., 2016. Association

- between *Strongyloides stercoralis* infection and cortisol secretion in alcoholic patients. *Acta Trop.* 154, 133–138.
- Soares, N.M., Leal, T.F., Fiúza, M.C., Reis, E.a.G., Souza, M.a.L., Dos-Santos, W.L., Pontes-De-Carvalho, L., 2010. Plasma lipoproteins in visceral leishmaniasis and their effect on Leishmania-infected macrophages. *Parasite Immunol.* 32, 259–266, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01187.x>.
- Teixeira, M.C.A., Inês, E.J., Pacheco, F.T.F., Silva, R.K.N.R., Mendes, A.V., Adorno, E.V., Lima, F.M., Soares, N.M., 2010. Asymptomatic *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in an alcoholic patient with intense anemia. *J. Parasitol.* 96, 833–835, <http://dx.doi.org/10.1645/GE-2358.1>.
- Thayer, J.F., Hall, M., Sollers III, J.J., Fischer, J.E., 2006. Alcohol use, urinary cortisol, and heart rate variability in apparently healthy men: evidence for impaired inhibitory control of the HPA axis in heavy drinkers. *Int. J. Psychophysiol.* 59, 244–250, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2005.10.013>, Cortisol and the Addictions.
- van der Gaag, M.S., van Tol, A., Scheek, L.M., James, R.W., Urgert, R., Schaafsma, G., Hendriks, H.F.J., 1999. Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity; a diet-controlled, randomised intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis* 147, 405–410, [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9150\(99\)00243-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9150(99)00243-9).
- van der Gaag, M.S., Tol, A., van Vermunt, S.H.F., Scheek, L.M., Schaafsma, G., Hendriks, H.F.J., 2001. Alcohol consumption stimulates early steps in reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* 42, 2077–2083.
- Vincent-Viry, M., Sass, M., Bastien, S., Aguilon, D., Siest, G., Visvikis, S., 2003. PON1-192 phenotype and genotype assessments in 918 subjects of the stanislas cohort study: clinical chemistry and laboratory medicine. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41, 535–540.
- Wiedermann, U., Stemberger, H., Unfried, E., Widhalm, K., Kundi, M., Altenriederer, M., Savedra, M., Wiedermann, G., 1991. Intestinal worm burden and serum cholesterol or lipid concentration in a shipibo population (Peru). *Zentralblatt Für Bakteriol.* 275, 279–286, [http://dx.doi.org/10.1016/S0934-8840\(11\)80077-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0934-8840(11)80077-0).
- Wu, D., Cederbaum, A.I., 2003. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res. Health* 27, 277–284.
- de Ramos, T.M.B., de Vasconcelos, A.S., de Carvalho, V.C.O., de Lima, V.L.M., 2004. Alterations in cholesterol, triglyceride and total phospholipid levels in plasma of *Callithrix jacchus* (saglii) reinfected by *Schistosoma mansoni*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37, 37–40, <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822004000100010>.

ANEXO C: *Strongyloides stercoralis* Infection in Alcoholic Patients

Marcia C. A. Teixeira, Flavia T. F. Pacheco, **Joelma N. Souza**, Mônica L. S. Silva, Elizabete J. Inês, and Neci M. Soares

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 40170115 Salvador, BA, Brazil

Review Article

Strongyloides stercoralis Infection in Alcoholic Patients

Marcia C. A. Teixeira, Flavia T. F. Pacheco, Joelma N. Souza, Mônica L. S. Silva, Elizabeth J. Inês, and Neci M. Soares

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 40170115 Salvador, BA, Brazil

Correspondence should be addressed to Marcia C. A. Teixeira; marciat@ufba.br

Received 15 September 2016; Accepted 13 November 2016

Academic Editor: João S. Silva

Copyright © 2016 Marcia C. A. Teixeira et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The course of *Strongyloides stercoralis* infection is usually asymptomatic with a low discharge of rhabditoid larva in feces. However, the deleterious effects of alcohol consumption seem to enhance the susceptibility to infection, as shown by a fivefold higher strongyloidiasis frequency in alcoholics than in nonalcoholics. Moreover, the association between *S. stercoralis* infection and alcoholism presents a risk for hyperinfection and severe strongyloidiasis. There are several possible mechanisms for the disruption of the host-parasite equilibrium in ethanol-addicted patients with chronic strongyloidiasis. One explanation is that chronic ethanol intake stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis to produce excessive levels of endogenous cortisol, which in turn can lead to a deficiency in type 2 T helper cells (Th2) protective response, and also to mimic the parasite hormone ecdysone, which promotes the transformation of rhabditiform larvae to filariform larvae, leading to autoinfection. Therefore, when untreated, alcoholic patients are continuously infected by this autoinfection mechanism. Thus, the early diagnosis of strongyloidiasis and treatment can prevent serious forms of hyperinfection in ethanol abusers.

1. Introduction

Strongyloides stercoralis infection is prevalent in countries with tropical and subtropical climates and affects approximately 370 million people worldwide [1, 2]. The helminth has the ability to multiply within a host, regardless of the mode of exogenous contamination, due to the transformation of rhabditoid larvae into infective filariform larvae, leading to persistent infections. However, in most hosts, the course of parasitism remains quiescent with no significant morbidity. This parasite-host balance can be disrupted under conditions of impaired cellular immunity, resulting in the life-threatening strongyloidiasis condition [3]. Immunosuppressed patients with chronic strongyloidiasis are at high risk of developing serious complications, such as hyperinfection syndrome and the dissemination of the parasite to several organs, causing sepsis and even death. High risk groups for *S. stercoralis* infection and hyperinfection include patients under massive corticoid therapy, HTLV-1 coinfecting individuals, and chronic alcoholics [4–6].

Many studies have demonstrated that chronic alcohol abuse predisposes an individual to *S. stercoralis* infection. In

alcoholics with hepatic cirrhosis, the infection may evolve to hyperinfection and life-threatening strongyloidiasis. The high predisposition to *S. stercoralis* infection has been associated with poor hygiene practices, malnutrition, the impairment of protective immune responses induced by excessive alcohol intake, and increase in endogenous corticoid levels, favoring *S. stercoralis* autoinfection [5, 7].

Correct diagnoses, treatments, and clinical follow-ups of parasitological cures are essential because strongyloidiasis relapse events have often been observed in patients receiving improper treatment [8]. Despite the high prevalence of strongyloidiasis in endemic countries and an increasing number of fatal cases, the World Health Organization (WHO) did not include strongyloidiasis in its original list of 17 neglected tropical diseases. Therefore, the main purpose of this article is to review the association between strongyloidiasis and chronic alcoholism, including describing the organic changes induced by both pathologies; the adverse effects of alcohol that predispose an individual to *S. stercoralis* infection and hyperinfection; and the current diagnostic tools and therapies for strongyloidiasis.

2. *Strongyloides stercoralis* Infection and Strongyloidiasis

The *Strongyloides stercoralis* threadworm is a soil-transmitted nematode that resides in the small intestine of human hosts. The parasitic infection takes place when filariform larvae penetrate through the skin, usually of the feet, and migrate through the bloodstream to the lungs [9]. After ascending the respiratory tract to the oropharynx, larvae are swallowed and reach the duodenal mucosal crypts to grow into parthenogenetic females that produce embryonated-eggs. Thereafter, rhabditoid larvae hatch from the eggs and are excreted in feces. However, some larvae may transform into the filariform infective stage and penetrate the perirectal mucosa or skin, thereby reentering the circulatory system and starting the cycle again. Therefore, if not treated, because this is an autoinfection process, the host may remain in a chronic carrier state for decades [10].

Strongyloides stercoralis usually causes an asymptomatic infection and a small rhabditoid larvae load in feces [11]. However, hyperinfection and dissemination can occur in high risk groups, such as patients undergoing glucocorticoid therapy [12], patients coinfecting with HTLV-1 [13] or HIV [14], lymphoma patients [15], and people with malnutrition [16] or with liver cirrhosis due to alcoholism [17].

The clinical manifestations of infection with *S. stercoralis* comprise a broad spectrum of signs and symptoms and can be divided into four clinical presentations: (a) acute strongyloidiasis, (b) chronic strongyloidiasis, (c) hyperinfection syndrome, and (d) disseminated disease. The clinical signs of acute strongyloidiasis are associated with the penetration of larva in the host and their passage through the lungs. Infected individuals may experience an itchy papular rash at the site of invasion. Depending on the number of larvae, their passage through the lungs can produce bronchospasm, coughing, and respiratory distress stemming from eosinophilic pneumonitis and leading to Loeffler syndrome, which is characterized by pulmonary infiltrations in chest radiographies and peripheral blood eosinophilia. When parthenogenetic females reach and colonize the intestinal mucosa, recurrent abdominal pain may occur sometimes resembling peptic ulcers [6, 18].

Chronic strongyloidiasis most frequently leads to an asymptomatic infection in immunocompetent individuals. Peripheral eosinophilia or elevated total IgE levels greater than 250 IU/mL may be observed in up to 75% of infected hosts [19], serving as a marker for differential diagnoses for travelers to or immigrants from endemic areas with high and persistent levels of eosinophilia [20]. In symptomatic patients with chronic diseases, nonspecific gastrointestinal manifestations, such as abdominal pain, vomiting, diarrhea, and constipation, may also be observed [11].

S. stercoralis hyperinfection is considered to be an enhanced form of autoinfection and is typically, but not always, a result of changes in the immune status [21]. In hyperinfection syndrome, signs and symptoms of increased larval migration appear: *Larva Currens* in the perianal region, recurrent asthma, and exacerbation of gastrointestinal symptoms, followed by the detection of large numbers of larvae in sputum and feces [22, 23]. Radiographs frequently

demonstrate focal or bilateral interstitial infiltrates in lungs. A retrospective study analyzed the endoscopic findings of 25 patients, mostly being treated for HTLV-1 or under corticosteroid therapy. These patients presented with *S. stercoralis* hyperinfection before beginning parasitological treatments for strongyloidiasis and revealed mostly edematous and erythematous mucosa, intestinal mucosa erosion, white villi, stenosis, and hemorrhage [24]. Duodenitis, including villous atrophy and destruction and inflammatory cell infiltration, was more severe in patients whose duodenal biopsies were positive for larvae than in those with negative biopsies [24]. As described above, hyperinfection syndrome implies, as interpreted by many clinicians, the presence of signs and symptoms attributable to increased number of migrating larvae through intestinal tract and lungs. However, some patients may continuously excrete huge parasite loads in feces and remain asymptomatic, likely due to the protection afforded by high levels of specific IgE [25]. Independent of these symptoms, in hyperinfection, the larvae are located in organs which normally carry the infection cycle without spreading to ectopic locations [6, 22].

Disseminated infection indicates the migration of the larvae to organs away from the normal cycle path inside a host (i.e., the lungs and the intestine). Infective larvae can be found virtually in any organ or system, such as the central nervous system, lymph nodes, heart, pancreas, kidneys, ovaries, and skeletal muscles, as indicated by clinical manifestations [26]. Large numbers of larvae penetrating through the intestinal wall may carry bacteria into the bloodstream and result in systemic infections, which may occur even during hyperinfection. The disseminated strongyloidiasis is often fatal, because of its rapid evolution and late diagnoses [3].

3. Epidemiology of Strongyloidiasis and Association with Alcoholism

Strongyloidiasis has a wide geographic distribution especially in populations of developing countries of tropical and subtropical areas. Various factors can influence *S. stercoralis* prevalence, including the integrity of immunity, socioeconomic status, sanitary and hygiene conditions of individuals, the level of heat and humidity, which affect parasite development in soil [27, 28], and the laboratory methods used for diagnosis [29, 30]. The prevalence of strongyloidiasis in a population can be divided into three categories: sporadic (<1%), endemic (1–5%), and hyperendemic (>5%) [31].

According to a systematic review based on published *Strongyloides* infection rates and taking into account the sensitivity of the used diagnostic methods, the prevalence of *Strongyloides* in Africa varied from 0.1% in the Central African Republic to up to 91.8% in Gabon. In South America and Central America, Haiti reported a prevalence of 1.0%, while in Peru the infection rate was as high as 75.3%. In Cambodia, the infection rate was 17.5%, whereas in Thailand, the rate was 23.7% and in Lao PDR, the rate was 26.2% [29]. Brazil is considered a hyperendemic country with 5.5% of *S. stercoralis* infection in general population and 11.8% in immunosuppressed individuals, considering the

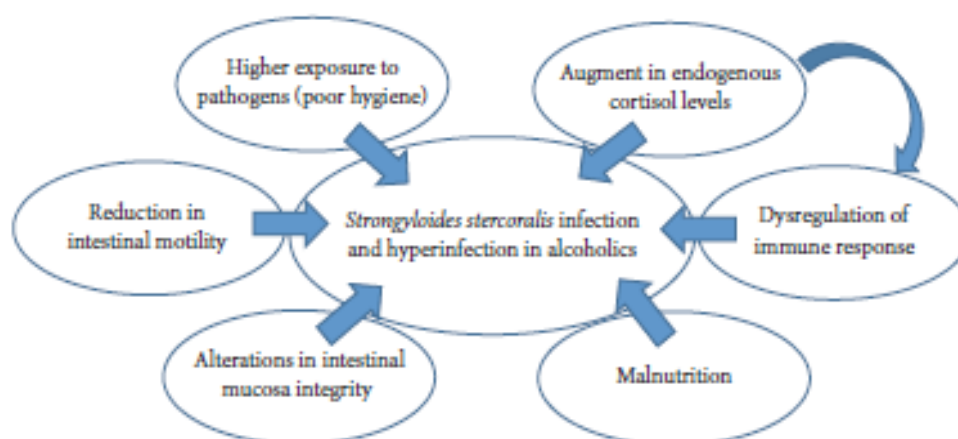


FIGURE 1: Factors associated with increased *Strongyloides stercoralis* infection and hyperinfection susceptibility in alcoholics.

parasitological diagnosis [32]. Moreover, there are areas of low endemicity in western European countries (France, Italy, and Switzerland), Eastern Europe (Poland and areas of the former Soviet Union), the United States (Appalachia and southern states), Japan (Okinawa), and Australia (Aboriginal people) [29, 33, 34].

In patients who chronically use alcohol, the prevalence of infection by *S. stercoralis* is usually high, ranging from 20.5% to 40.2% [5, 7, 17, 35]. A study conducted in Brazil showed a 33.3% infection frequency in alcoholic patients. This value was even higher (44.4%) in patients with liver cirrhosis, whereas only 5.5% of nonalcoholic individuals were infected [35]. The amount of alcohol intake was proportional to the increased infection frequency, reaching 48% in patients who drank more than 450 g of alcohol per day [5]. Moreover, 40.2% of patients with liver cirrhosis of alcoholic etiology treated in a university hospital of Brazil had *S. stercoralis* infection [17]. Another interesting study conducted in Brazil showed that, in a group of 100 patients with HIV/AIDS, 12% were infected with *S. stercoralis* and of these, 64.3% were chronic alcoholics [14], suggesting a synergism between the susceptibility factors. In addition, a recent meta-analysis of three case-control studies showed an association between alcoholism and *S. stercoralis* infection with a significant increase in the risk of infection in alcoholics (OR: 6.69; CI: 1.47 to 33.8) [29]. Conversely, a study in Costa Rica found a lower rate of 5.7% (6/106) of *S. stercoralis* infection in alcoholic patients when compared with the frequencies found in Brazil. However, the rate of infection in the entire Costa Rica population was 0.1%, indicating that alcoholics were four to five times more susceptible to *S. stercoralis* infection [36], as observed in Brazilian studies. In fact, our group reported an occurrence of 23.5% of *S. stercoralis* infection in alcoholics from the Brazilian Northeast [37].

There are also case reports that have shown the association between alcoholism and *S. stercoralis* infection. A patient attended by our laboratory without gastrointestinal or pulmonary symptoms presented with very intense anemia and a high discharge of *Strongyloides* larvae in his stool. He was not under glucocorticoid therapy and tested negative for HTLV and HIV but had a history of alcohol addiction for

more than 20 years [25]. Another case described a colitis caused by *S. stercoralis* in a woman dependent on alcohol and without the HTLV-1 virus. The patient had been infected for 27 years with worsening chronic strongyloidiasis due in part to the impairment of her cellular immune response resulting from the chronic use of alcohol and malnourishment [38].

In immunocompromised patients, including alcohol addicts, chronic strongyloidiasis may persist for decades. Additionally, due to the autoinfection mechanism of the parasite, chronic strongyloidiasis may result in hyperinfection and spread to other organs [6, 18, 25]. Despite the fact that alcoholism is one of the conditions observed in patients with *S. stercoralis* hyperinfection, only in the past decade controlled studies showed that strongyloidiasis is more frequent in alcoholic than nonalcoholic patients [7, 35].

Of the factors contributing to the high susceptibility to *S. stercoralis* infection, the poor hygiene of alcoholics promotes heteroinfection in environments with inadequate sanitary conditions and autoinfection by larvae present in fecal residue on the perianal skin [5]. Another factor that contributes to high infection rates could be attributed to reductions in gastrointestinal transit, which are caused by the effects of ethanol on intestinal muscle proteins or on vagal stimulation [39, 40]. Because the reduced intestinal motility enables the rhabditoid larvae to mature to the filariform infective stage, the risk of autoinfection is increased. Other authors have also emphasized that the dysregulation of the immune system caused by excessive ethanol intake may promote the survival of the parasite and autoinfection by increasing the endogenous production of corticosteroids [7, 35]. Ethanol intoxication has been shown to activate the HPAaxis, which elevates corticosteroids levels [41–44], which in turn suppresses T-cell function and decreases intestinal immunity [45, 46]. Alcoholics may also present reduced numbers of macrophages in the duodenal mucosa and deficiencies in IgA secretion, which could be partially responsible for the high incidence of *S. stercoralis* intestinal infections [47, 48]. A schematic figure with the suggested mechanisms for higher predispositions of ethanol-addicted individuals for strongyloidiasis is presented in Figure 1.

4. Immune Response to *S. stercoralis* and Immunity Alterations Induced by Chronic Alcohol Intake

As in most helminth infections, the dominant cellular immune response to *S. stercoralis* is Th2. The IL-4 and IL-5 interleukins stimulate the production of IgE, which in turn induces mast cell degranulation and mucus secretion by goblet cells [49]. Peristalsis induced by IL-4 and IL-13 with the mucus facilitates the expulsion of the helminths, while toxic granules released by mast cells can cause direct damage to the parasite [50]. Moreover, IL-4 and IL-5 promote the activation of eosinophils, which plays an important role in host defense. Eosinophils are not only directly involved in the innate immune response against helminth larvae but are also involved in the adaptive immune response [49, 51, 52]. They act as antigen-presenting cells and increase the production of Th2 cytokines, such as IL-4, IL-5, and IL-13, and, consequently, the production of specific antibodies IgE, IgG, and IgM that eliminate the parasite [51, 53, 54]. Furthermore, the degranulation of eosinophils on the surface of the parasite through antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) results in the release of toxic molecules that induce the removal of helminth [55].

In patients infected with *S. stercoralis*, eosinophilia can be more frequent than in other parasite infections. This phenomenon is caused by the habitation of parthenogenetic females in the intestinal submucosa and not in the lumen, which results in a more intense eosinophilic reaction [2, 56]. The eosinophil-dependent mechanisms are also involved in filarial larvae killing of *Strongyloides* [57, 58]. Therefore, the absence of eosinophils is a poor prognostic indicator for infection by *S. stercoralis*, particularly for immunocompromised patients [59].

The role of antibodies in protective immune responses against *S. stercoralis* has been demonstrated in the passive transfer of anti-*S. stercoralis* antibodies to naïve animals [60]. Furthermore, the humoral immune response plays an important role in autoinfection control because IgA antibodies limit the amount of secreted larvae presumably by inhibiting the fecundity of the parthenogenetic female and the viability of eggs. The binding of IgE to effector cell receptors, especially those of mast cells and basophils, induces degranulation and the release of inflammatory mediators, which lead to the death and expulsion of the worm. In addition, the binding of IgE to mast cells present in the intestine releases sulfated proteoglycans, which not only hamper the establishment of *S. stercoralis* in the intestinal epithelium but also stimulate muscle contraction. These mechanisms contribute to the expulsion of the intestinal parasite [58, 61, 62]. Conversely, IgG4 can block the IgE-mediated immune response, contributing to the persistence of asymptomatic strongyloidiasis [63]. *Strongyloides* infection can also stimulate regulatory T cells (T_{reg}), an escape mechanism of the parasite, which suppresses the protective immune response, such as the eosinophil-dependent activation by IL-5 [64].

Current medical literature recognizes that excessive alcohol use is associated with reduced host defense, including

antimicrobial defense, antiviral immunity, and altered host repair [65–67]. Alcohol leads to the stimulation of the HPA axis and produces excessive levels of cortisol [68]. There is high correlation between the neuroendocrine and immune systems, especially in the sensitivity of the immune system to stress and its interaction with the HPA axis. This interaction was principally revealed by the immunosuppressive actions of glucocorticoids, especially cortisol, which can affect the transcription of numerous inflammatory molecules [68]. This interaction between the HPA axis and the immune system is crucial for body homeostasis; however, in alcohol abuse conditions, the equilibrium of this interaction is compromised. At excessive quantities, glucocorticoids have serious adverse effects due to their immunosuppressive action and metabolic abnormalities [69, 70]. Moreover, glucocorticoids upregulate IL-18, which enhances myeloperoxidase activity and alters the intestinal barrier function [71]. Neutrophils may also play a role in increasing intestinal permeability in both acute and chronic ethanol intoxication [45, 72]. The IL-18-mediated increase in chemokines and adhesion molecules likely causes intense neutrophil accumulation in the intestinal tissue, contributing to the impairment of intestinal immunity [45, 71].

The strong association between high alcohol use and heightened cortisol levels also indirectly contributes to *S. stercoralis* autoinfection. Hydrocortisone, or cortisol, is a corticosteroid hormone produced by the cortex of adrenal glands directly involved in stress response. Corticosteroids produce metabolites that resemble hydroxyecdysone (Figure 2), an ecdysteroid hormone that regulates the fertility of parthenogenetic *S. stercoralis* females, induces the transformation of rhabditiform to infective filariform larvae, and increases the rate of autoinfection [8, 18, 25]. The presence of a steroid receptor on *S. stercoralis* could be involved in the pathogenesis of hyperinfection syndrome and disseminated strongyloidiasis [18, 73]. The cortisol metabolites could bind to this receptor and exacerbate the transformation of rhabditoid larvae to the filarial stage. This action leads to the invasion of the intestinal mucosa, resembling the autoinfection mechanism observed in patients under massive corticosteroid therapy [73, 74]. In fact, we have recently observed that high endogenous cortisol levels in alcoholic patients may not be associated with susceptibility to *S. stercoralis* infection; however, once infected, this may lead to a high parasite load [37].

In contrast to the inhibitory effects of acute alcohol ingestion, prolonged alcohol intake results in increased macrophage TNF- α production and the activation of the inflammatory cascade [75, 76]. In alcoholic hepatitis, a disease resulting from chronic alcohol intake, the levels of proinflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-1, and IL-6, are highly elevated [77]. The highest TNF- α levels were correlated with liver dysfunction. However, light-to-moderate drinking had no significant effect on the levels of serum TNF- α [78].

There are two proposed mechanisms by which chronic alcohol use can induce inflammation: (1) gut microflora-derived lipopolysaccharides (LPS), which act as key players in alcohol-mediated inflammation [79] and alcohol metabolism

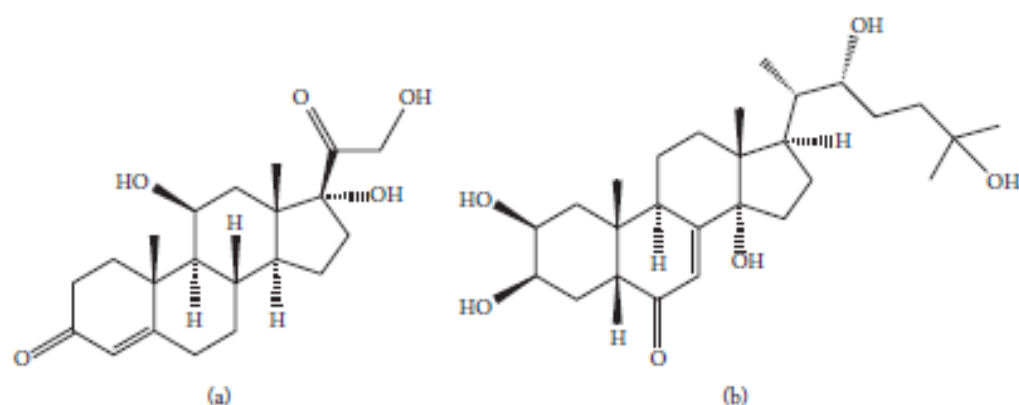


FIGURE 2: Chemical structure of cortisol (a) and ecdysone (b). Adapted from Wikipedia.

through the production of reactive oxygen species (ROS), and (2) cell damage, which initiates the production of proinflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-6 [80]. Regarding cytokine production, one possible mechanism is an increase in the TLR4 stimulation-induced proinflammatory cytokine production and NF- κ B activation [75]. However, during the overactivation of monocytes, such as during the combined stimulation of TLR2 and TLR4, proinflammatory cytokine production can be increased even with acute alcohol ingestion [75]. A few studies have demonstrated that both acute and chronic alcohol consumption enhanced the expression of anti-inflammatory cytokines [76, 81].

Acute and chronic alcohol exposure can interfere with several aspects of the adaptive immune response [82]. Acute alcohol intoxication impairs the antigen-presenting ability and differentiation of dendritic cells (DC). This effect is more potent in affecting antigen presentation and antigen-specific T-cell activation than in monocytes or macrophages [83]. The alcohol-induced defects in DC functions include reduced levels of CD80 and CD86 on the cell surfaces (essential to induce activation of T cells) and decreased production of IL-12 (critical for stimulating naïve CD4⁺ T cells to develop into Th1 cells) [82]. Thus, acute alcohol intake may inhibit the Th1 immune response and may predispose the host organism to Th2 responses. The suppression of IL-12 seems to be partially responsible for this shift [82]. The activation of Th2 as an anti-inflammatory response seems to coincide with the cytokine expression profiles observed during acute alcohol intake. It is expected that during chronic alcohol use, a Th1 response dominates over a Th2 response. Therefore, the hyperinfection of *S. stercoralis* in chronic alcoholics could be explained by the same mechanism observed in the *S. stercoralis*-HTLV-1 coinfection. The shift from Th2 to Th1 immune responses resulted in decreased levels of IL-4, IL-5, IL-13, and IgE and the synergistic severity of the disease [84]. Another possible mechanism for the impaired Th2 response in alcoholics may be associated with Th2 cell apoptosis induced by increased endogenous glucocorticoid levels, leading to *S. stercoralis* hyperinfection [74]. However, it was demonstrated that chronic alcoholics have elevated levels of IgE, a typical immunoglobulin involved in Th2 response [85]. Therefore, further studies are needed to clarify

the mechanisms of immune response in alcoholic individuals coinfecting with *S. stercoralis*.

5. *S. stercoralis* Diagnosis and Treatment

The clinical diagnosis of strongyloidiasis is presumptive because the signs and symptoms are nonspecific and can be confused with those of other intestinal parasitosis [86]. Currently, laboratory diagnoses are routinely performed to identify rhabditoid larvae in feces. However, in most cases, the parasite load is low and the shedding of larvae is intermittent, which can interfere with the efficiency of parasitological methods [87, 88]. Therefore, to increase the sensitivity of parasitological examination, at least three stool samples must be analyzed on alternate days using different diagnostic methods [89–91]. However, the repeated delivery of samples to the laboratory may be inconvenient for patients due to distances between residences and the laboratory and extended travel times. Because of these factors, a sufficient number of samples are not always examined.

Several parasitological methods are used for the detection of *S. stercoralis* larvae in feces, such as the Baermann-Moraes [92], Harada-Mori filter paper culture [93], agar plate culture (CPA) [94], TF-Test® [95], and formol-ether concentration techniques [96]. In these methods, several technical factors can alter the sensitivity of strongyloidiasis diagnosis, for example, sample homogenization, stool processing delays, erroneous morphological differentiations from nematode larvae, and inadequate numbers or preservation of samples [97]. The Baermann-Moraes is inexpensive and simple to perform and one of the most used parasitological methods for nematode larva identification in routine laboratories; however, it is less sensitive than the CPA technique [98–100]. Additionally, CPA allow the differential diagnosis between species of *S. stercoralis* and hookworms based on the type of migration paths (furrows) left by the larvae in agar plates [100].

Due to the limitations of parasitological methods, the use of more sensitive immunological tests is critical for the diagnosis of strongyloidiasis. ELISAs are the most widely used immunodiagnostic methods and have shown sensitivities and specificities above 70.0%, depending on the screened

antigen and antibody isotype [101–104]. However, because of difficulties in the production and the standardization of antigens capable of providing reproducible results, the use of ELISAs remains limited [30]. Uncertainties regarding positive reactions may occur in cases of hidden strongyloidiasis (i.e., low parasite burdens), immunological memory of past infections, or the presence of similar antigens among helminths [104]. In fact, the presence of cross-reactivity with other helminths is considered to be one of the most important limitations in strongyloidiasis immunoassays [101, 105], especially in endemic countries. Conversely, in areas where the infection is uncommon, the detection of specific antibodies is more reliable.

In a recent study, the diagnosis of strongyloidiasis by IgE-ELISA, using as antigen the “strongylastacin,” an enzyme secreted by infective larvae of *S. stercoralis*, showed high sensitivity and high specificity [106]. The detection of IgA anti-*S. stercoralis* can also aid in the diagnosis of strongyloidiasis [107], especially in patients without excretion of rhabditoid larvae in feces. Due to the immunomodulation of IgA during infections, the results of stool tests are usually negative [63]. The suggested mechanisms by which IgA modulates the removal of host larvae include reductions of female fertility and of the intensity of the autoinfection [108]. ELISAs can also be applied for the detection of *S. stercoralis* antigens in stool samples (coproantigen), even though these tests have not yet been standardized [109, 110].

Other immunoassays, such as western blots, can be used to confirm strongyloidiasis diagnoses in cases of discordant serological tests or negative parasitological samples. Silva et al. [105] demonstrated that 96.0% of sera from patients with strongyloidiasis recognized immunodominant antigens of *Strongyloides ratti*. According to western blots, the sera from infected patients can recognize different molecular antigenic patterns. For instance, Sato et al. [111] revealed four antigens with molecular weights of 97, 66, 41, and 26 kDa; Ravi et al. [112] described a 38 kDa molecule and Sudré et al. [113] identified 26 and 33 kDa immunodominant molecules. However, no consensus or agreement in the literature has been reached regarding immunodominant *S. stercoralis* molecular patterns that can be used as standardized references for the diagnosis of strongyloidiasis.

Polymerase chain reaction (PCR) assays are also considered to be sensitive and specific method for the diagnosis of *S. stercoralis* [114, 115]. However, as in the parasitological analysis of feces, PCR assays depend on the shedding of larvae, which only occurs on an intermittent basis. Moreover, PCR assays are expensive and require skilled labor and complex infrastructure not commonly used in routine clinical laboratories, especially in those of endemic areas.

Eosinophilia has also been considered as a nonspecific laboratory marker for the screening of chronic strongyloidiasis, especially for asymptomatic individuals from endemic areas [27, 116, 117]. The location of parthenogenetic females in intestinal mucosa and larvae transit through tissues, especially the lungs, stimulate immune responses mediated by eosinophils [2, 56].

Despite the several existing strongyloidiasis diagnosis methods, there remains no ideal standard tool. A reliable

diagnosis is particularly important for patients from endemic areas, especially those in groups at higher risk of developing hyperinfection or disseminated strongyloidiasis.

Due to the autoinfection process, all patients should be treated to prevent the development of strongyloidiasis severe cases. Albendazole, thiabendazole, and ivermectin have been used as therapeutic agents for strongyloidiasis. For many years, thiabendazole was the treatment of choice. However, the use of the drug was associated with unpleasant side effects, such as nausea, vomiting, malaise, and neuropsychiatric symptoms, and is no longer available in some countries [118–120]. Albendazole, another benzimidazole compound with broad-spectrum anthelmintic activity, remains widely used for strongyloidiasis treatment in some countries where oral ivermectin is not yet available [119, 121]. However, the efficacy of albendazole in *S. stercoralis* treatment is inconsistent, especially for hyperinfection risk groups [8, 122–124].

Currently, ivermectin seems to provide the best outcomes for treating *S. stercoralis* and is strongly recommended for severe cases, such as hyperinfection and disseminated disease. Ivermectin—a member of a family of macrocyclic lactones, the avermectins—has broad spectrum activity against parasites. It binds to glutamate-gated chloride ion channels, which are present in invertebrate nerve and muscle cells, and causes paralysis and death of the parasite. It does not easily cross the blood-brain barrier in humans and has a low affinity for mammalian ligand-gated chloride channels [125]. Ivermectin demonstrated better efficacy than albendazole and had less adverse effects than thiabendazole. Moreover, adverse reactions after ivermectin treatment are rarely experienced, transient, and well tolerated [119, 122, 126].

The administration of two single doses of 200 µg/kg ivermectin given two weeks apart is more suitable for treating chronic strongyloidiasis than a single dose [120, 127]. In immunocompromised patients, to prevent the recurrence of hyperinfection syndrome, two doses of ivermectin are administered every two weeks, for six weeks [128]. Thereafter, patients with hyperinfection require follow-up stool exams. These exams use highly sensitive diagnostic methods and are performed for 2–4 weeks to confirm the clearance of the infection because the internal parasite development cycle is a two-week long process [128–130]. In patients presenting with stool examinations positive for *Strongyloides* or persistent symptoms, if a recrudescence of larvae is observed, retreatment is indicated.

6. Conclusion

Chronic alcoholism can cause damage to a patient, including adverse effects in the gastrointestinal tract and the immune system. These effects may render patients more susceptible to parasitic infections. Studies have demonstrated a higher frequency of *Strongyloides stercoralis* in chronic alcoholics when compared with nonalcoholics. This phenomenon has been attributed to the breakdown of local protective barriers, higher exposure to pathogens, malnutrition, endogenous production of corticosteroids, and alterations to host immune defense mechanisms.

Although many hypotheses have been raised, due to the multifactorial pathogenic effects induced by alcohol, the specific mechanism or group of mechanisms involved in the high susceptibility of alcoholics to *S. stercoralis* infection and hyperinfection are not completely understood. Further studies with large numbers of alcoholic patients, infected and noninfected with *S. stercoralis*, should be conducted. These studies should focus on cortisol levels, local and systemic immune responses to parasites, mucosa alterations, and estimations of parasite loads.

In high risk groups, such as patients with chronic alcoholism, the diagnosis of strongyloidiasis should be performed using more sensitive parasitological methods, such as with agar plate cultures, combined with an immunological test for the detection of anti-*S. stercoralis* antibodies. The recommended treatment is ivermectin, even in the absence of symptoms, due to possibility of autoinfection and the development of severe cases of hidden strongyloidiasis.

Additional Points

Chronic alcoholism is a risk factor that leads to strongyloidiasis infection and hyperinfection. Regular ethanol intake may lead to an immune modulation or alteration in corticosteroid metabolism, favoring *S. stercoralis* autoinfection. Both chronic ethanol addiction and *S. stercoralis* hyperinfection can significantly damage the intestinal mucosa. The shedding of large numbers of larva may synergistically act with alcohol in eroding the mucosal layer and cause blood loss in the intestine, leading to malabsorption. Early diagnoses and treatments of strongyloidiasis in alcoholic patients are essential in endemic areas to prevent hyperinfection and the dissemination of the parasite.

Competing Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Authors' Contributions

Marcia C. A. Teixeira, Joelma N. Souza, Flavia T. F. Pacheco, and Mônica L. S. Silva performed the literature review and wrote the paper; Elizabete J. Inês and Neci M. Soares provided expertise in the diagnosis of *Strongyloides* and critical revision of the manuscript.

References

- [1] D. Greaves, S. Coggle, C. Pollard, S. H. Aliyu, and E. M. Moore, "Strongyloides stercoralis infection," *BMJ (Online)*, vol. 347, article f4610, 2013.
- [2] A. Requena-Méndez, P. Chiodini, Z. Bisoffi, D. Buonfrate, E. Gotuzzo, and J. Muñoz, "The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 7, no. 1, Article ID e2002, 2013.
- [3] C. S. Lam, M. K. H. Tong, K. M. Chan, and Y. P. Siu, "Disseminated strongyloidiasis: a retrospective study of clinical course and outcome," *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 25, no. 1, pp. 14–18, 2006.
- [4] D. Buonfrate, A. Angheben, F. Gobbi et al., "Imported strongyloidiasis: epidemiology, presentations, and treatment," *Current Infectious Disease Reports*, vol. 14, no. 3, pp. 256–262, 2012.
- [5] C. C. Marques, M. D. P. Zago-Gomes, C. S. Gonçalves, and F. E. L. Pereira, "Alcoholism and *Strongyloides stercoralis*: daily ethanol ingestion has a positive correlation with the frequency of *Strongyloides* larvae in the stools," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 4, no. 6, article no. e717, 2010.
- [6] P. B. Keiser and T. B. Nutman, "Strongyloides stercoralis in the immunocompromised population," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 17, no. 1, pp. 208–217, 2004.
- [7] M. P. Zago-Gomes, K. F. Aikawa, S. F. Perazzo, C. S. Gonçalves, and F. E. Pereira, "Prevalence of intestinal nematodes in alcoholic patients," *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 35, no. 6, pp. 571–574, 2002.
- [8] J. N. De Souza, P. R. L. Machado, M. C. A. Teixeira, and N. M. Soares, "Recurrence of strongyloides stercoralis infection in a patient with Hansen's disease: a case report," *Leprosy review*, vol. 85, no. 1, pp. 58–62, 2014.
- [9] H. O. Dada-Adegbola, O. A. Oluwatoba, and R. A. Bakare, "Strongyloidiasis: prevalence, risk factors, clinical and laboratory features among diarrhea patients in Ibadan Nigeria," *African Journal of Medicine and Medical Sciences*, vol. 39, no. 4, pp. 285–292, 2010.
- [10] V. Prendki, P. Fenaux, R. Durand, M. Thellier, and O. Bouchaud, "Strongyloidiasis in man 75 years after initial exposure," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 17, no. 5, pp. 931–932, 2011.
- [11] D. I. Grove, "Human strongyloidiasis," *Advances in Parasitology*, vol. 38, pp. 251–309, 1995.
- [12] L. B. Lemos, Z. Qu, R. Laucirica, and H. L. Fred, "Hyperinfection syndrome in strongyloidiasis: report of two cases," *Annals of Diagnostic Pathology*, vol. 7, no. 2, pp. 87–94, 2003.
- [13] M. A. F. Porto, A. Muniz, J. Jr. Oliveira, and E. M. Carvalho, "Clinical and immunological consequences of the association between HTLV-1 and strongyloidiasis," *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 35, no. 6, pp. 641–649, 2002.
- [14] C. V. da Silva, M. S. Ferreira, A. S. Borges, and J. M. Costa-Cruz, "Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients: experience at a teaching hospital in central Brazil," *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, vol. 37, no. 3, pp. 211–215, 2005.
- [15] A. Safdar, K. Malathum, S. J. Rodriguez, R. Husni, and K. V. I. Rolston, "Strongyloidiasis in patients at a comprehensive cancer center in the United States: a retrospective study covering the years 1971–2003," *Cancer*, vol. 100, no. 7, pp. 1531–1536, 2004.
- [16] H. Dada-Adegbola and R. Bakare, "Strongyloidiasis in children five years and below," *West African Journal of Medicine*, vol. 23, no. 3, pp. 194–197, 2004.
- [17] D. Gaburri, A. K. Gaburri, E. Hubner et al., "Intestinal parasitosis and hepatic cirrhosis," *Arquivos de Gastroenterologia*, vol. 34, no. 1, pp. 7–12, 1996.
- [18] L. A. Marcos, A. Terashima, M. Canales, and E. Gotuzzo, "Update on strongyloidiasis in the immunocompromised host," *Current Infectious Disease Reports*, vol. 13, no. 1, pp. 35–46, 2011.
- [19] C. L. Rossi, E. E. H. Takahashi, C. D. Partel, L. G. V. L. Teodoro, and L. J. da Silva, "Total serum IgE and parasite-specific IgG and IgA antibodies in human strongyloidiasis," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 35, no. 4, pp. 361–365, 1993.

- [20] G. G. Baaten, G. J. Sonder, T. van Gool, J. A. Kint, and A. van den Hoek, "Travel-related schistosomiasis, strongyloidiasis, filariasis, and toxocarosis: the risk of infection and the diagnostic relevance of blood eosinophilia," *BMC Infectious Diseases*, vol. 11, article no. 84, 2011.
- [21] R. N. Husni, S. M. Gordon, D. L. Longworth, and K. A. Adal, "Disseminated *Strongyloides stercoralis* infection in an immunocompetent patient," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 23, no. 3, article 663, 1996.
- [22] R. Mejia and T. B. Nutman, "Screening, prevention, and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*," *Current Opinion in Infectious Diseases*, vol. 25, no. 4, pp. 458–463, 2012.
- [23] L. D. Corte, M. V. S. da Silva, and P. R. M. Souza, "Simultaneous larva migrans and larva currens caused by *Strongyloides stercoralis*: a case report," *Case Reports in Dermatological Medicine*, vol. 2013, Article ID 381583, 3 pages, 2013.
- [24] K. Kishimoto, A. Hokama, T. Hirata et al., "Endoscopic and histopathological study on the duodenum of *Strongyloides stercoralis* hyperinfection," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 14, no. 11, pp. 1768–1773, 2008.
- [25] M. C. A. Teixeira, E. J. Inês, F. T. F. Pacheco et al., "Asymptomatic strongyloides stercoralis hyperinfection in an alcoholic patient with intense anemia," *Journal of Parasitology*, vol. 96, no. 4, pp. 833–835, 2010.
- [26] A. Basile, S. Simzar, J. Bentow et al., "Disseminated *Strongyloides stercoralis*: hyperinfection during medical immunosuppression," *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 63, no. 5, pp. 896–902, 2010.
- [27] C. D. Ericsson, R. Steffen, A. A. Siddiqui, and S. L. Berk, "Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 33, no. 7, pp. 1040–1047, 2001.
- [28] A. Hall, D. J. Conway, K. S. Anwar, and M. L. Rahman, "Strongyloides stercoralis in an urban slum community in Bangladesh: factors independently associated with infection," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 88, no. 5, pp. 527–530, 1994.
- [29] F. Schär, U. Trostorf, F. Giardina et al., "*Strongyloides stercoralis*: global distribution and risk factors," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 7, no. 7, Article ID e2288, 2013.
- [30] F. M. De Paula, E. De Castro, M. D. R. D. F. Gonçalves-Pires, M. D. G. Marçal, D. M. B. Campos, and J. M. Costa-Cruz, "Parasitological and immunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlândia, state of Minas Gerais, Brazil," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, vol. 42, no. 1, pp. 51–55, 2000.
- [31] M. L. Pires and G. Dreyer, "Reverendo a importancia do *Strongyloides stercoralis*," *Revista do Hospital das Clinicas Faculdade de Medicina Universidade de Sao Paulo*, vol. 48, pp. 175–182, 1993.
- [32] F. M. Paula and J. M. Costa-Cruz, "Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil," *Parasitology*, vol. 138, no. 11, pp. 1331–1340, 2011.
- [33] S. Puthiyakunnon, S. Boddu, Y. Li et al., "Strongyloidiasis—an insight into its global prevalence and management," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 8, no. 8, Article ID e3018, 2014.
- [34] A. Miller, M. L. Smith, J. A. Judd, and R. Speare, "*Strongyloides stercoralis*: systematic review of barriers to controlling strongyloidiasis for Australian indigenous communities," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 8, no. 9, p. e3141, 2014.
- [35] L. C. Marques De Oliveira, C. T. Ribeiro, D. De Melo Mendes, T. C. Oliveira, and J. M. Costa-Cruz, "Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics," *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 97, no. 1, pp. 119–121, 2002.
- [36] L. Avendaño, F. Hernandez, F. Jimenez, A. Avila, and D. Castro, "*Strongyloides stercoralis* en pacientes alcohólicos," *Parasitología al día*, vol. 23, no. 3-4, 1999.
- [37] M. L. S. Silva, E. J. Inês, A. B. S. Souza et al., "Association between *Strongyloides stercoralis* and cortisol in alcoholic patients," *Acta Tropica*, vol. 154, pp. 133–138, 2016.
- [38] A. O. Lashof, W. J. Lesterhuis, G. Wanten, P. Beckers, and M. Keuter, "Colitis in an alcohol-dependent woman," *The Lancet*, vol. 369, no. 9578, p. 2050, 2007.
- [39] G. Addolorato, E. Capristo, G. Gasbarrini, and G. F. Stefanini, "Depression, alcohol abuse and oro-caecal transit time," *Gut*, vol. 41, no. 3, pp. 417–418, 1997.
- [40] M. Wegener, J. Schaffstein, U. Dilger, C. Coenen, B. Wedmann, and G. Schmidt, "Gastrointestinal transit of solid-liquid meal in chronic alcoholics," *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 36, no. 7, pp. 917–923, 1991.
- [41] J. E. Thayer, M. Hall, J. J. Sollers III, and J. E. Fischer, "Alcohol use, urinary cortisol, and heart rate variability in apparently healthy men: evidence for impaired inhibitory control of the HPA axis in heavy drinkers," *International Journal of Psychophysiology*, vol. 59, no. 3, pp. 244–250, 2006.
- [42] M. A. Choudhry, N. Fazal, M. Goto, R. L. Gamelli, and M. M. Sayeed, "Gut-associated lymphoid T cell suppression enhances bacterial translocation in alcohol and burn injury," *American Journal of Physiology—Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 282, no. 6, pp. G937–G947, 2002.
- [43] F. A. László, C. Varga, I. Pávó et al., "Vasopressin pressor receptor-mediated activation of HPA axis by acute ethanol stress in rats," *American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 280, no. 2, pp. R458–R465, 2001.
- [44] K. Ogilvie, S. Lee, B. Weiss, and C. Rivier, "Mechanisms mediating the influence of alcohol on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to immune and nonimmune signals," *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol. 22, no. 5, pp. 243S–247S, 1998.
- [45] M. A. Choudhry, X. Li, and I. H. Chaudry, "A role for corticosterone in impaired intestinal immunity and barrier function in a rodent model of acute alcohol intoxication and burn injury," *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, vol. 1, no. 4, pp. 428–434, 2006.
- [46] M. A. Choudhry, S. N. Rana, M. J. Kavanaugh, E. J. Kovacs, R. L. Gamelli, and M. M. Sayeed, "Impaired intestinal immunity and barrier function: a cause for enhanced bacterial translocation in alcohol intoxication and burn injury," *Alcohol*, vol. 33, no. 3, pp. 199–208, 2004.
- [47] A. Maier, C. Bode, P. Fritz, and J. C. Bode, "Effects of chronic alcohol abuse on duodenal mononuclear cells in man," *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 44, no. 4, pp. 691–696, 1999.
- [48] G. Pelletier, M. J. Briantais, C. Buffet, J. Pillot, and J. P. Etienne, "Serum and intestinal secretory IgA in alcoholic cirrhosis of the liver," *Gut*, vol. 23, no. 6, pp. 475–480, 1982.
- [49] N. C. Iriemenam, A. O. Sanyaolu, W. A. Oyibo, and A. F. Fagbenro-Beyioku, "*Strongyloides stercoralis* and the immune response," *Parasitology International*, vol. 59, no. 1, pp. 9–14, 2010.

- [50] D. N. Onah and Y. Nawa, "Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes," *Korean Journal of Parasitology*, vol. 38, no. 4, pp. 209–236, 2000.
- [51] U. M. Padigel, J. J. Lee, T. J. Nolan, G. A. Schad, and D. Abraham, "Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*," *Infection and Immunity*, vol. 74, no. 6, pp. 3232–3238, 2006.
- [52] M. H. Shin, Y. A. Lee, and D.-Y. Min, "Eosinophil-mediated tissue inflammatory responses in helminth infection," *Korean Journal of Parasitology*, vol. 47, pp. S125–S131, 2009.
- [53] A. M. Galioto, J. A. Hess, T. J. Nolan, G. A. Schad, J. J. Lee, and D. Abraham, "Role of eosinophils and neutrophils in innate and adaptive protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice," *Infection and Immunity*, vol. 74, no. 10, pp. 5730–5738, 2006.
- [54] U. M. Padigel, J. A. Hess, J. J. Lee et al., "Eosinophils act as antigen-presenting cells to induce immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 196, no. 12, pp. 1844–1851, 2007.
- [55] A. D. Klion and T. B. Nutman, "The role of eosinophils in host defense against helminth parasites," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 113, no. 1, pp. 30–37, 2004.
- [56] S. A. Repetto, P. A. Durán, M. B. Lasala, and S. M. González-Cappa, "High rate of strongyloidosis infection, out of endemic area, in patients with eosinophilia and without risk of exogenous reinfections," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 82, no. 6, pp. 1088–1093, 2010.
- [57] D. Negrão-Corrêa, "Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 43, no. 5, pp. 291–299, 2001.
- [58] H. Maruyama, Y. Yabu, A. Yoshida, Y. Nawa, and N. Ohta, "A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*," *Journal of Immunology*, vol. 164, no. 7, pp. 3749–3754, 2000.
- [59] P. R. S. Lagacé-Wiens and G. K. M. Harding, "A Canadian immigrant with coinfection of *Strongyloides stercoralis* and human T-lymphotropic virus 1," *CMAJ*, vol. 177, no. 5, pp. 451–453, 2007.
- [60] J. A. Ligas, L. A. Kerepesi, A. M. Galioto et al., "Specificity and mechanism of immunoglobulin M (IgM)- and IgG-dependent protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice," *Infection and Immunity*, vol. 71, no. 12, pp. 6835–6843, 2003.
- [61] W. Dawicki and J. S. Marshall, "New and emerging roles for mast cells in host defence," *Current Opinion in Immunology*, vol. 19, no. 1, pp. 31–38, 2007.
- [62] H. Maruyama, Y. Osada, A. Yoshida et al., "Protective mechanisms against the intestinal nematode *Strongyloides venezuelensis* in *Schistosoma japonicum*-infected mice," *Parasite Immunology*, vol. 22, no. 6, pp. 279–286, 2000.
- [63] N. S. Atkins, J. E. Lindo, M. G. Lee et al., "Humoral responses in human strongyloidiasis: correlations with infection chronicity," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 91, no. 5, pp. 609–613, 1997.
- [64] B. Blankenhaus, U. Klemm, M.-L. Eschbach et al., "*Strongyloides ratti* infection induces expansion of Foxp3+ regulatory T cells that interfere with immune response and parasite clearance in BALB/c Mice," *The Journal of Immunology*, vol. 186, no. 7, pp. 4295–4305, 2011.
- [65] G. Szabo and P. Mandrekar, "A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense," *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol. 33, no. 2, pp. 220–232, 2009.
- [66] C. S. Pavia, M. La Mothe, and M. Kavanagh, "Influence of alcohol on antimicrobial immunity," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 58, no. 2, pp. 84–89, 2004.
- [67] G. Szabo, "Consequences of alcohol consumption on host defence," *Alcohol and Alcoholism*, vol. 34, no. 6, pp. 830–841, 1999.
- [68] N. Rachdaoui and D. K. Sarkar, "Effects of alcohol on the endocrine system," *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*, vol. 42, pp. 593–615, 2013.
- [69] P. J. Barnes, "How corticosteroids control inflammation: quintiles prize lecture 2005," *British Journal of Pharmacology*, vol. 148, no. 3, pp. 245–254, 2006.
- [70] M. N. Silverman and E. M. Sternberg, "Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1261, no. 1, pp. 55–63, 2012.
- [71] X. Li, S. N. Rana, M. G. Schwacha, I. H. Chaudry, and M. A. Choudhry, "A novel role for IL-18 in corticosterone-mediated intestinal damage in a two-hit rodent model of alcohol intoxication and injury," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 80, no. 2, pp. 367–375, 2006.
- [72] Ö. Sir, N. Fazal, M. A. Choudhry, R. L. Gamelli, and M. M. Sayeed, "Neutrophil depletion prevents intestinal mucosal permeability alterations in burn-injured rats," *American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, vol. 278, no. 5, pp. R1224–R1231, 2000.
- [73] R. S. Vadlamudi, D. S. Chi, and G. Krishnaswamy, "Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome," *Clinical and Molecular Allergy*, vol. 4, article 8, 2006.
- [74] R. Concha, W. Harrington Jr., and A. I. Rogers, "Intestinal strongyloidiasis: recognition, management, and determinants of outcome," *Journal of Clinical Gastroenterology*, vol. 39, no. 3, pp. 203–211, 2005.
- [75] F. T. Crews, R. Bechara, L. A. Brown et al., "Cytokines and alcohol," *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol. 30, no. 4, pp. 720–730, 2006.
- [76] P. Mandrekar, S. Bala, D. Catalano, K. Kodys, and G. Szabo, "The opposite effects of acute and chronic alcohol on lipopolysaccharide-induced inflammation are linked to IRAK-M in human monocytes," *Journal of Immunology*, vol. 183, no. 2, pp. 1320–1327, 2009.
- [77] C. J. McClain, S. Barve, I. Deaciuc, M. Kugelmas, and D. Hill, "Cytokines in alcoholic liver disease," *Seminars in Liver Disease*, vol. 19, no. 2, pp. 205–220, 1999.
- [78] A. Gonzalez-Quintela, J. Campos, L. Loidi, C. Quinteiro, L.-E. Perez, and F. Gude, "Serum TNF- α levels in relation to alcohol consumption and common TNF gene polymorphisms," *Alcohol*, vol. 42, no. 6, pp. 513–518, 2008.
- [79] H. J. Wang, S. Zakhari, and M. K. Jung, "Alcohol, inflammation, and gut-liver-brain interactions in tissue damage and disease development," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 16, no. 11, pp. 1304–1313, 2010.
- [80] J. Haorah, S. H. Ramirez, N. Floreani, S. Gorantla, B. Morsey, and Y. Persidsky, "Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 45, no. 11, pp. 1542–1550, 2008.
- [81] R. Heinz and C. Waltenbaugh, "Ethanol consumption modifies dendritic cell antigen presentation in mice," *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol. 31, no. 10, pp. 1759–1771, 2007.

- [82] P. E. Molina, K. I. Happel, P. Zhang, J. K. Kolls, and S. Nelson, "Focus on: alcohol and the immune system," *Alcohol Research and Health*, vol. 33, no. 1-2, pp. 97-108, 2010.
- [83] D. Kabelitz, D. Wesch, and H.-H. Oberg, "Regulation of regulatory T cells: role of dendritic cells and toll-like receptors," *Critical Reviews in Immunology*, vol. 26, no. 4, pp. 291-306, 2006.
- [84] T. Hirata, N. Uchima, K. Kishimoto et al., "Impairment of host immune response against *Strongyloides stercoralis* by human T cell lymphotropic virus type 1 infection," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 74, no. 2, pp. 246-249, 2006.
- [85] M. J. Domínguez-Santalla, C. Vidal, J. Viñuela, L. E. Pérez, and A. González-Quintela, "Increased serum IgE in alcoholics: relationship with Th1/Th2 cytokine production by stimulated blood mononuclear cells," *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol. 25, no. 8, pp. 1198-1205, 2001.
- [86] A. Olsen, L. van Lieshout, H. Marti et al., "Strongyloidiasis—the most neglected of the neglected tropical diseases?" *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 103, no. 10, pp. 967-972, 2009.
- [87] P. Uparanukraw, S. Phongsri, and N. Morakote, "Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 60, no. 6, pp. 967-973, 1999.
- [88] L. X. Liu and P. F. Weller, "Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections," *Infectious Disease Clinics of North America*, vol. 7, no. 3, pp. 655-682, 1993.
- [89] Y. Sato, J. Kobayashi, H. Toma, and Y. Shiroma, "Efficacy of stool examination for detection of *Strongyloides* infection," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 53, no. 3, pp. 248-250, 1995.
- [90] G. Dreyer, E. Fernandes-Silva, S. Alves, A. Rocha, R. Albuquerque, and D. Addiss, "Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: implications for diagnosis and clinical trials," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 34, no. 10, pp. 2569-2571, 1996.
- [91] S. Jongwutiwes, M. Charoenkorn, P. Sithichareonchai, P. Akarabornvorn, and C. Putaporntip, "Increased sensitivity of routine laboratory detection of *Strongyloides stercoralis* and hookworm by agar-plate culture," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 93, no. 4, pp. 398-400, 1999.
- [92] R. G. Moraes, "Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidiase no Brasil," *Revista de Saúde Pública*, vol. 1, pp. 507-624, 1948.
- [93] P. Martín-Rabadán, P. Muñoz, J. Palomo, and E. Bouza, "Strongyloidiasis: the harada-mori test revisited," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 5, no. 6, pp. 374-376, 1999.
- [94] T. Arakaki, H. Hasegawa, R. Asato et al., "A new method to detect *Strongyloides stercoralis* from human stool," *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 16, no. 1, pp. 11-17, 1988.
- [95] J. F. Gomes, S. Hoshino-Shimizu, L. C. Dias, A. J. S. A. Araujo, V. L. P. Castilho, and F. A. M. A. Neves, "Evaluation of a novel kit (TF-Test) for the diagnosis of intestinal parasitic infections," *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, vol. 18, no. 2, pp. 132-138, 2004.
- [96] L. S. Ritchie, "An ether sedimentation technique for routine stool examinations," *Bulletin of the U.S. Army Medical Department*, vol. 8, article 326, 1948.
- [97] C. Ukaga, P. Onyeka, and B. E. Nwoke, *Practical Medicine Parasitology*, Avan Global, 1st edition, 2002.
- [98] J. M. Blatt and G. A. Cantos, "Evaluation of techniques for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in human immunodeficiency virus (HIV) positive and HIV negative individuals in the city of Itajaí, Brazil," *The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, vol. 7, no. 6, pp. 402-408, 2003.
- [99] P. M. Intapan, W. Maleewong, T. Wongsaraj, S. Singthong, and N. Morakote, "Comparison of the quantitative formalin ethyl acetate concentration technique and agar plate culture for diagnosis of human strongyloidiasis," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 43, no. 4, pp. 1932-1933, 2005.
- [100] E. D. J. Inês, J. N. Souza, R. C. Santos et al., "Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens," *Acta Tropica*, vol. 120, no. 3, pp. 206-210, 2011.
- [101] E. J. Inês, M. L. S. Silva, J. N. Souza, M. C. A. Teixeira, and N. M. Soares, "The role of glycosylated epitopes in the serodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection," *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 76, no. 1, pp. 31-35, 2013.
- [102] A. L. R. Goncalves, C. A. Rocha, H. T. Gonzaga, M. D. R. D. F. Goncalves-Pires, M. T. Ueta, and J. M. Costa-Cruz, "Specific IgG and IgA to larvae, parthenogenetic females, and eggs of *Strongyloides venezuelensis* in the immunodiagnosis of human strongyloidiasis," *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 72, no. 1, pp. 79-84, 2012.
- [103] N. D. Feliciano, H. T. Gonzaga, M. D. R. F. Gonçalves-Pires et al., "Hydrophobic fractions from *strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis," *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 67, no. 2, pp. 153-161, 2010.
- [104] H. R. Van Doorn, R. Koelewijn, H. Hofwegen et al., "Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 45, no. 2, pp. 438-442, 2007.
- [105] L. P. Silva, I. S. C. Barcelos, A. B. P. Lima, F. S. Espindola, D. M. B. Campos, and J. M. Costa-Cruz, "Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 98, no. 5, pp. 687-691, 2003.
- [106] R. Varatharajalu, V. Parandaman, M. Ndao, J. E. Andersen, and F. A. Neva, "Strongyloides stercoralis excretory/secretory protein strongylastacin specifically recognized by IgE antibodies in infected human sera," *Microbiology and Immunology*, vol. 55, no. 2, pp. 115-122, 2011.
- [107] V. S. Ribeiro, N. D. Feliciano, H. T. Gonzaga et al., "Detergent fraction of heterologous antigen to detect IgA and IgG in strongyloidiasis using saliva and serum paired samples," *Immunology Letters*, vol. 134, no. 1, pp. 69-74, 2010.
- [108] N. S. Atkins, D. J. Conway, J. F. Lindo, J. W. Bailey, and D. A. P. Bundy, "L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlations with larval output," *Parasite Immunology*, vol. 21, no. 10, pp. 517-526, 1999.
- [109] A. M. Sykes and J. S. McCarthy, "A coproantigen diagnostic test for *Strongyloides* infection," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, no. 2, article e955, 2011.
- [110] P. Taweethavonsawat, W. Chaicumpa, U. Chaisri et al., "Specific monoclonal antibodies to *Strongyloides stercoralis*: a potential diagnostic reagent for strongyloidiasis," *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, vol. 20, no. 4, pp. 247-256, 2002.
- [111] Y. Sato, F. Inoue, R. Matsuyama, and Y. Shiroma, "Immunoblot analysis of antibodies in human strongyloidiasis," *Transactions*

- of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 84, no. 3, pp. 403–406, 1990.
- [112] V. Ravi, S. Ramachandran, R. W. Thompson, J. F. Andersen, and F. A. Neva, "Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 125, no. 1–2, pp. 73–81, 2002.
- [113] A. P. Sudré, R. C. Siqueira, M. G. M. Barreto, R. H. S. Peralta, H. W. Macedo, and J. M. Peralta, "Identification of a 26-kDa protein fraction as an important antigen for application in the immunodiagnosis of strongyloidiasis," *Parasitology Research*, vol. 101, no. 4, pp. 1117–1123, 2007.
- [114] S. Kramme, N. Nissen, H. Soblik et al., "Novel real-time PCR for the universal detection of *Strongyloides* species," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 60, no. 4, pp. 454–458, 2011.
- [115] J. J. Verweij, M. Canales, K. Polman et al., "Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 103, no. 4, pp. 342–346, 2009.
- [116] G. V. Gill and J. W. Bailey, "Eosinophilia as a marker for chronic strongyloidiasis: use of a serum ELISA test to detect asymptomatic cases," *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, vol. 83, no. 3, pp. 249–252, 1989.
- [117] T. B. Nutman, E. A. Ottesen, S. Ieng et al., "Eosinophilia in Southeast Asian refugees: evaluation at a referral center," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 155, no. 2, pp. 309–313, 1987.
- [118] D. I. Grove, "Treatment of strongyloidiasis with thiabendazole: an analysis of toxicity and effectiveness," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 76, no. 1, pp. 114–118, 1982.
- [119] A. A. Adenusi, A. O. Oke, and A. O. Adenusi, "Comparison of ivermectin and thiabendazole in the treatment of uncomplicated human *Strongyloides stercoralis* infection," *African Journal of Biotechnology*, vol. 2, no. 11, pp. 465–469, 2004.
- [120] Y. Suputtamongkol, N. Premasathian, K. Bhumimuang et al., "Efficacy and safety of single and double doses of ivermectin versus 7-day high dose albendazole for chronic strongyloidiasis," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, no. 5, Article ID e1044, 2011.
- [121] A. A. Adenusi, "Cure by ivermectin of a chronic, persistent, intestinal strongyloidosis," *Acta Tropica*, vol. 66, no. 3, pp. 163–167, 1997.
- [122] A. Datry, I. Hilmarsdottir, R. Mayorga-Sagastume et al., "Treatment of *Strongyloides stercoralis* infection with ivermectin compared with albendazole: results of an open study of 60 cases," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 88, no. 3, pp. 344–345, 1994.
- [123] N. Mbendi, M. N. Mashako, M. Lukuni, and Z. L. Ndongala, "Anguillulose et albendazole: traitement en un seul jour avec une dose unique répartie en trois prises," *Médecine et Chirurgie Digestive*, vol. 17, pp. 129–131, 1988.
- [124] S. Pungpak, D. Bunnag, D. Chindanond, and B. Radmoyos, "Albendazole in the treatment of strongyloidiasis," *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, vol. 18, no. 2, pp. 207–210, 1987.
- [125] A. J. Wolstenholme and A. T. Rogers, "Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics," *Parasitology*, vol. 131, supplement 1, pp. S85–S95, 2005.
- [126] Z. Bisoffi, D. Buonfrate, A. Angheben et al., "Randomized clinical trial on ivermectin versus thiabendazole for the treatment of strongyloidiasis," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, no. 7, article e1254, 2011.
- [127] O. Zaha, T. Hirata, N. Uchima, F. Kinjo, and A. Saito, "Comparison of anthelmintic effects of two doses of ivermectin on intestinal strongyloidiasis in patients negative or positive for anti-HTLV-1 antibody," *Journal of Infection and Chemotherapy*, vol. 10, no. 6, pp. 348–351, 2004.
- [128] B. R. Mirdha, "Human strongyloidiasis: often brushed under the carpet," *Tropical Gastroenterology: Official Journal of the Digestive Diseases*, vol. 30, no. 1, pp. 1–4, 2009.
- [129] M. A. Miller, L. W. P. Church, and C. D. Salgado, "*Strongyloides* hyperinfection: a treatment dilemma," *The American Journal of the Medical Sciences*, vol. 336, no. 4, pp. 358–361, 2008.
- [130] P. Lichtenberger, I. Rosa-Cunha, M. Morris et al., "Hyperinfection strongyloidiasis in a liver transplant recipient treated with parenteral ivermectin: case report," *Transplant Infectious Disease*, vol. 11, no. 2, pp. 137–142, 2009.

ANEXO D: Parecer do Comitê de Ética

ESCOLA DE ENFERMAGEM DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação entre a infecção por *Strongyloides stercoralis* e a produção de cortisol induzida pelo álcool: diagnóstico da estrogiloidíase e identificação de biomarcadores das alterações imunes e metabólicas.

Pesquisador: Neci Matos Soares

Área Temática: Área 5. Novos procedimentos ainda não consagrados na literatura.

Versão: 2

CAAE: 10470713.8.0000.5531

Instituição Proponente: Faculdade de Farmácia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 367.464

Data da Relatoria: 11/09/2013

Apresentação do Projeto:

Este trabalho tem como objetivo geral diagnosticar a infecção pelo *S. stercoralis* e estudar a associação entre esta infecção e os níveis de cortisol, induzido pelo uso excessivo de álcool, além de caracterizar alterações imunes, metabólicas e hematológicas, através de marcadores biológicos. Serão coletadas amostras de fezes, sangue e soro provenientes de pacientes alcoólicos internados em regime de curta duração (aproximadamente 23 dias), com acompanhamento por uma equipe de médicos, enfermeiros, farmacêuticos e por psicoterapeutas sob a coordenação da Dra. Maria Del Carmen

Moleiro, na unidade de desintoxicação do CATA, pertencente às Obras Sociais Irmã Dulce. Nos grupos controles estão incluídos pacientes alcoólicos sem infecção pelo *S. stercoralis* e pacientes infectados com *S. stercoralis*, sem história de uso abusivo de álcool. Parte dos exames será realizado no Laboratório que faz parte das Obras Sociais Irmã Dulce e os exames mais especializados serão realizados no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia, UFBA, este Laboratório atende em torno de 250 pacientes/dia pelo SUS. As amostras de fezes serão examinadas pelos métodos de sedimentação espontânea, Baermann-Moraes e cultura em placa de agar. Para o imunodiagnóstico será realizado o ELISA para pesquisa de IgG e IgE anti-*S. stercoralis*.

Endereço: Rua Augusto Viana S/N 3º Andar

Bairro: Canela

CEP: 41.110-060

UF: BA

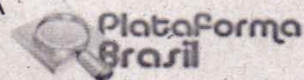
Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-7615

Fax: (71)3283-7615

E-mail: cepee.ufba@ufba.br

ESCOLA DE ENFERMAGEM DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA



Continuação do Parecer: 367.464

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram especificados possíveis riscos no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o mesmo procedimento foi adotado no Projeto apresentado.

"Estê estudo pode contribuir para melhorar a saúde da população, porém a sua participação pode trazer algum risco ou desconforto para a sua pessoa, tais como hematomas ou dor na região de coleta de sangue. Este risco no procedimento de coleta das amostras será minimizado através de orientações adequadas e profissionais experientes na realização do procedimento."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Considero o projeto relevante e factível. A meu ver a metodologia está adequada aos objetivos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os Termos foram apresentados a saber;

1. Termo de aceitação do Projeto pela instituição onde o mesmo será executado "Obras Sociais Irmã Dulce - Hospital Santo Antônio";
2. Declaração da coordenadora do projeto de que a coleta de dados não foi iniciada;
3. Declaração da coordenadora do projeto de que apresentará o relatório parcial e final;
4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente corrigido.

Recomendações:

Foram atendidas as recomendações do CEP.EE.UFBA.

Foram especificados os critérios de inclusão dos participantes da pesquisa e como estes serão abordados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

A plenária homologa o parecer de APROVAÇÃO emitido pelo relator.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Endereço: Rua Augusto Viana S/N 3º Andar

Bairro: Canela

CEP: 41.110-060

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-7615

Fax: (71)3283-7615

E-mail: cepee.ufba@ufba.br

ESCOLA DE ENFERMAGEM DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA



Continuação do Parecer: 367.464

As amostras de soros também serão utilizadas para pesquisa de IgG, IgE e IgA totais, determinações bioquímicas, dosagem de citocinas, cortisol, marcadores de alterações hepáticas e lipídicas, através de Kits disponíveis no comércio, além da atividade da PON determinada indiretamente pelo método colorimétrico da formação do pnitrofenol, a partir da utilização do paraoxon. A funcionalidade do HDL será avaliada pela incorporação de colesterol livre e esterificação do colesterol. A avaliação hematológica será realizada através do hemograma, dosagem de ferro sérico, ferritina, ácido fólico e vitamina B12.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Realizar o diagnóstico da infecção por *Strongyloides stercoralis* e estudar a associação entre esta infecção e os níveis de cortisol, induzido pelo uso excessivo de álcool, além de caracterizar as alterações imunes metabólicas através de marcadores biológicos.

Objetivo Secundário:

- Conhecer a frequência da infecção por *S. stercoralis* em pacientes alcoólicos atendidos no Centro de Acolhimento e Tratamento de Alcoolistas (CATA), pertencente às Obras Sociais Irmã Dulce, através do diagnóstico parasitológico e imunológico;
- Padronizar os ELISAs para detecção de anticorpos anti-*S. stercoralis* utilizando antígenos de superfície excretado/secretado e obtido por digestão enzimática de *S. venezuelensis* e comparar as suas sensibilidades e especificidades com o ELISA utilizando antígeno bruto;
- Caracterizar as moléculas imunodominantes dos antígenos de superfície de *S. venezuelensis* através do Western blotting; -Avaliar a associação entre a infecção por *S. stercoralis* e os níveis de cortisol endógeno em pacientes alcoólicos e não alcoólicos; -Estudar o perfil das citocinas circulantes (IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, TGF- β e IL-10) nos pacientes portadores da comorbidade infecção por *S. stercoralis* e alcoolismo e nos grupos controles;
- Identificar o perfil lipídico, a atividade da paraoxonase, a funcionalidade do HDL e as alterações das enzimas hepáticas nos pacientes alcoólicos, infectados ou não com *S. stercoralis*;
- Caracterizar as alterações hematológicas para diferenciação da anemia por deficiência de ferro, da anemia megaloblástica nos pacientes infectados por *S. stercoralis* e por outros helmintos.

Endereço: Rua Augusto Viana S/N 3º Andar

Bairro: Canela

CEP: 41.110-060

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-7615

Fax: (71)3283-7615

E-mail: cepee.ufba@ufba.br

ESCOLA DE ENFERMAGEM DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA



Continuação do Parecer: 367.464

SALVADOR, 21 de Agosto de 2013

Darci Santa Rosa

Assinador por:

DARCI DE OLIVEIRA SANTA ROSA
(Coordenador)

Endereço: Rua Augusto Viana S/N 3º Andar

Bairro: Canela

CEP: 41.110-060

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-7615

Fax: (71)3283-7615

E-mail: cepee.ufba@ufba.br

ANEXO E: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Instituição: Laboratório de Pesquisa em Parasitologia da Faculdade de Farmácia – Universidade Federal da Bahia – Salvador, Bahia, Brasil.

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da pesquisa “**Associação entre a infecção por *Strongyloides stercoralis* e a produção de cortisol induzida pelo álcool: diagnóstico da strongiloidíase e identificação de biomarcadores das alterações imunes e metabólicas**”, sob a responsabilidade da pesquisadora Dr^a Neci Matos Soares, a qual pretende realizar o diagnóstico da infecção por *Strongyloides stercoralis* e estudar a associação entre esta infecção e os níveis de cortisol induzido pelo uso excessivo de álcool, além de caracterizar as alterações imunes e metabólicas através de marcadores biológicos.

Sua participação é voluntária e se dará por meio de doação de sangue e fezes e pelo preenchimento de um questionário socioeconômico. Este estudo pode contribuir para melhorar a saúde da população, além de lhe proporcionar uma avaliação mais completa do seu estado de saúde. Todos os dados obtidos através desta pesquisa irão retornar para o senhor (a) em forma de laudos médicos, o que poderá auxiliar no seu tratamento. Porém, a sua participação pode trazer algum risco ou desconforto para a sua pessoa, tais como hematomas ou dor na região de coleta de sangue. Este risco no procedimento de coleta das amostras será minimizado através de orientações adequadas e profissionais experientes na realização do procedimento.

Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando do estudo, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. A sua identidade será mantida em sigilo, em conformidade ao princípio da confidencialidade. Caso tenha qualquer dúvida, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço Rua Barão do Jeremoabo, nº 147, Ondina - Salvador, Bahia - Brasil, CEP 40.170-115 - telefone (71) 3283-6950 (Laboratório de Pesquisa em Parasitologia da Faculdade de Farmácia– Universidade Federal da Bahia – LACTFAR/UFBA), ou poderá entrar em contato com os Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Escola de Enfermagem da UFBA (rua Augusto Viana, s/n, sala 435 - Canela - Salvador, Bahia - Brasil - telefone: (71) 3283-7615) ou das Obras Sociais Irmã Dulce (OSID) (Avenida Bonfim, 161 Largo de Roma, Salvador – Bahia, telefone: (71) 3310-1335).

Consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

Impressão Datiloscópica

Assinatura do orientador responsável

Assinatura do aluno (a) pesquisador

Instituições Parceiras



OBRAS SOCIAIS
IRMÃ DULCE

Financiamento



fapesb

Fundação de Amparo
à Pesquisa do Estado da Bahia



Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós Graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100
Salvador, Bahia, Brasil

<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>