

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS E IMUNOCOMPLEXOS CIRCULANTES NO  
DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE EM ALCOOLISTAS**

**ALANA ARANTES SANTOS GONÇALVES**

**UBERLÂNDIA-MG**

**2018**

**ALANA ARANTES SANTOS GONÇALVES**

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS E IMUNOCOMPLEXOS CIRCULANTES NO  
DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE EM ALCOOLISTAS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Marques de Oliveira

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Julia Maria Costa-Cruz

**UBERLÂNDIA-MG**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

G635d  
2018      Gonçalves, Alana Arantes Santos, 1983  
            Detecção de anticorpos e imunocomplexos circulantes no  
            diagnóstico da estrogiloidíase em alcoolistas / Alana Arantes Santos  
            Gonçalves. - 2018.  
            122 f. : il.

Orientador: Robinson Sabino da Silva.

Coorientador: Luiz Carlos Marques de Oliveira.

Coorientadora: Julia Maria Costa-Cruz.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.455>

Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Strongyloides stercoralis - Teses. 3.  
Alcoolismo - Teses. 4. Diagnóstico parasitológico - Teses. I. Silva,  
Robinson Sabino da. II. Oliveira, Luiz Carlos Marques de. III.  
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde. IV. Costa-Cruz, Júlia Maria. V. Título.

---

CDU: 61

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

ALANA ARANTES SANTOS GONÇALVES

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS E IMUNOCOMPLEXOS CIRCULANTES NO  
DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE EM ALCOOLISTAS**

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Uberlândia, 23 de fevereiro de 2018.

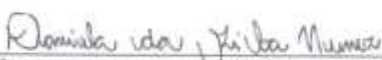
**Banca Examinadora:**

  
Prof.ª Dra. Julia Maria Costa-Cruz, UFU/MG

  
Prof.ª Dra. Luciana de Almeida Silva Teixeira, UFTM/MG

  
Prof.ª Dra. Vanessa da Silva Ribeiro, UFG/GO

  
Prof.ª Dra. Celene Maria de Oliveira Simões Alves, UFU/MG

  
Prof.ª Dra. Daniela da Silva Nunes, UFU/MG

## DEDICATÓRIA

A Deus, a Ele toda honra e toda glória.

Aos meus pais, **José (*in memorian*) e Sebastiana** pelo incentivo, apoio e confiança essenciais para a realização deste trabalho.

Aos meus queridos avós **Geraldo e Ninfa; Deusdeth e Élio** que nunca mediram esforços para me auxiliar durante toda minha vida acadêmica.

Ao meu esposo, **Fabricio**, pela compreensão e companheirismo durante todo este caminho.

“Vocês sempre demonstraram preocupação e hoje conseguimos juntos mais essa vitória”. Minha eterna gratidão!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** que com graça e amor infinitos me guiou até este momento, dando-me a certeza de que eu não estava só, nos momentos em que me sentia assim.

Ao Prof. Dr. **Luiz Carlos Marques de Oliveira**, pela disponibilidade de tempo generosamente dedicado a mim, transmitindo-me úteis pensamentos e idéias com paciência e dedicação. “Tenho o privilégio de tê-lo como exemplo”.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Julia Maria Costa-Cruz**, pelo seu constante incentivo na busca pelo conhecimento científico. Pelo apoio e compreensão que sempre demonstrou. Minha eterna admiração.

Ao Prof. Dr. **Robinson Sabino da Silva** pela atenção e pelas oportunidades oferecidas.

À mestranda **Camila de Almeida Lopes**, que esteve ao meu lado desde o início desta caminhada. Pela paciência, pelo apoio e auxílio indispensável em todas as etapas deste trabalho; e em especial por sua amizade. Minha eterna gratidão.

Ao Dr. **Henrique Tomaz Gonzaga**, pelo apoio estatístico na realização deste trabalho. Pelo auxílio na análise de dados. Por seus ensinamentos e paciência.

Ao Dr. **Marcelo Arantes Levenhagen** pelos ensinamentos, atenção e participação.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, **Gisele de Melo Rodrigues** e **Viviane Gonçalves**, por toda atenção e competência.

A **todos do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses**: Gabriela Borges da Silva, Daniela da Silva Nunes, Renata Araújo Cunha, Dayane Costa, Jéssica Peixoto Rodrigues, José Eduardo Neto de Souza, Edson Fernando Goulart de Carvalho e Lucas Silva de Faria, pelo companheirismo, acolhimento e disposição que sempre tiveram para me ensinar. “Como é gratificante saber que existem pessoas no mundo como vocês”.

Aos **pacientes dos CAPS-ad e UAPS Custódio Pereira** que concordaram em participar da pesquisa proposta e concederam a oportunidade de realizar este trabalho. Obrigada por terem contribuído com a construção do conhecimento.

Aos **funcionários dos CAPS-ad e UAPS Custódio Pereira** que gentilmente me receberam durante toda a coleta de dados. Pelo carinho e colaboração que me ofereceram.

“A concretização de um sonho é sempre um motivo para comemorações. Por isso gostaria de agradecer a todos aqueles que ajudaram a torná-lo realidade”.

A transformação acontece quando escolhemos a paz, mesmo tendo razões para a guerra:

*“Tenho vos dito isto, para que em Mim tenhais paz; no mundo tereis aflições, mas tende bom ânimo; Eu venci o mundo”.*

(João 16:33)

## RESUMO

**Introdução:** A estrogiloidíase humana é uma parasitose negligenciada considerada um problema de saúde pública. O risco da infecção por *Strongyloides stercoralis* tem sido associado a grupos específicos de pacientes, entre os quais se incluem os alcoolistas. **Objetivo:** Detectar anticorpos IgG e IgA anti-*Strongyloides*, imunocomplexos IgG circulantes e índice de avididade de anticorpos IgG em amostras de soro em indivíduos alcoolistas e não alcoolistas. **Material e Métodos:** Foram analisadas amostras de fezes e soro de 140 indivíduos de Uberlândia, MG, sendo 70 alcoolistas atendidos no Centro de Atenção Psicossocial Álcool e outras drogas (CAPS-ad) e 70 não alcoolistas atendidos na Unidade de Atenção Primária à Saúde (UAPS) Custódio Pereira. Utilizou-se os métodos parasitológicos de Cultura em Placa de Ágar (CPA) e Hoffman, Pons e Janer (HPJ) para análise de cada uma das três amostras de fezes disponibilizadas pelos pacientes e o método *enzyme linked-immunosorbent assay* (ELISA) para detecção de anticorpos IgG e IgA anti-*Strongyloides*, imunocomplexos (IC) e avididade de anticorpos IgG em amostras de soro. Os dados foram analisados utilizando o programa computacional *GraphPad Prism*. Significância estatística foi considerada com um valor de  $p < 0,05$ . **Resultados:** A presença de larvas de *S. stercoralis* nas fezes foi observada em 12 (17,1%) indivíduos alcoolistas e em 1 (1,4%) indivíduo não alcoolista. A frequência de resultados positivos, considerando no mínimo uma amostra de fezes positiva para *S. stercoralis*, foi maior pelo método de CPA [28/34 (82,3%)] do que pelo método de HPJ [14/34 (41,2%)]. Nas amostras de soro, as frequências de positividade de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* e de imunocomplexos foram maiores entre indivíduos alcoolistas do que entre indivíduos não alcoolistas. A detecção de anticorpos IgA anti-*Strongyloides* foi menor em indivíduos alcoolistas quando comparado aos não alcoolistas. O valor da mediana em relação à IgG anti-*Strongyloides* e imunocomplexos IgG entre alcoolistas foi maior do que entre não alcoolistas. No entanto, o valor da mediana em relação à detecção de anticorpos IgA anti-*Strongyloides* foi menor em amostras de soro de indivíduos alcoolistas quando comparado aos não alcoolistas. Entre os 12 indivíduos alcoolistas com exames parasitológicos positivos para *S. stercoralis*, 1 (8,3%) não apresentou anticorpos IgG anti-*Strongyloides*, 5 (41,7%) foram negativos para imunocomplexos e 9 (75,0%) não apresentaram anticorpos IgA anti-*Strongyloides* nas amostras de soro. Alcoolistas tiveram correlação positiva entre os níveis de IgG anti-*Strongyloides* e IC; entre os níveis de IgG anti-*Strongyloides* e IgA anti-*Strongyloides* e entre os níveis de IC e IgA anti-*Strongyloides*. No entanto, entre os indivíduos não alcoolistas não houve correlação positiva entre os níveis de anticorpos. A média do índice de avididade nas amostras de soro entre alcoolistas foi maior do que entre não alcoolistas. Em relação ao índice de avididade, entre os 11 indivíduos alcoolistas com exames parasitológicos positivos para *S. stercoralis* e que apresentaram anticorpos IgG anti-*Strongyloides*, 10 (90,9%) apresentam índice de avididade acima de 75%. **Conclusão:** O aprimoramento dos métodos diagnósticos é necessário para melhorar os estudos epidemiológicos e as medidas de controle e prevenção da estrogiloidíase, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Com base neste conceito, a detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides*, de imunocomplexos circulantes e a determinação do índice de avididade em amostras de soro se mostraram uma alternativa potencial para o diagnóstico precoce da estrogiloidíase em indivíduos alcoolistas.

**Palavras-chave:** *Strongyloides stercoralis*, alcoolistas, imunodiagnóstico, diagnóstico parasitológico.



## ABSTRACT

### DETECTION OF CIRCULATING ANTIBODIES AND IMMUNE COMPLEXES FOR STRONGYLOIDIASIS DIAGNOSIS IN ALCOHOLICS

**Introduction:** Human strongyloidiasis is a neglected parasitic disease considered a public health problem. The risk of infection by *Strongyloides stercoralis* has been associated with specific groups of patients, including alcoholics. **Objective:** Detect anti-*Strongyloides* IgG and IgA antibodies, circulating immune complexes and IgG avidity antibodies in serum samples of alcoholic and nonalcoholic subjects. **Material and Methods:** Samples of feces and serum of 140 individuals from Uberlândia, MG, were analyzed: 70 alcoholics from the Centro de Atenção Psicossocial Álcool e outras drogas (CAPS-ad) and 70 nonalcoholics from the Unidade de Atenção Primária à Saúde (UAPS) Custódio Pereira. The parasitological methods used were Agar Plate Culture (APC) and Hoffman, Pons and Janer (HPJ) for analysis of the three stool samples provided by the patients and the *enzyme linked-immunosorbent assay* (ELISA) method for the detection of anti-*Strongyloides* IgG and IgA, immune complexes and avidity of IgG antibodies in serum samples. Data were analyzed using the computer program *GraphPad Prism*. Statistical significance was considered when  $P < 0.05$ . **Results:** The presence of *S. stercoralis* larvae in stool was observed in 12 (17.1%) alcoholic individuals and 1 (1.4%) non-alcoholic individual. Frequency of positive results, considering at least one positive stool sample for *S. stercoralis*, was greater by the APC method [28/34 (82,3%)] than by HPJ [14/34 (41,2%)]. In serum samples, anti-*Strongyloides* IgG and immune complex positivity was higher among alcoholics than non-alcoholics. Detection of anti-*Strongyloides* IgA was lower in alcoholic individuals when compared to non-alcoholics. The median value for anti-*Strongyloides* IgG and immune complex in alcoholics was higher than in non-alcoholics. However, the median value in relation to anti-*Strongyloides* IgA was lower in serum samples of alcoholic individuals. Among the 12 alcoholic subjects with positive parasitological tests for *S. stercoralis*, 1 (8.3%) did not present anti-*Strongyloides* IgG antibodies, 5 (41.7%) were negative for immune complexes and 3 (75.0%) had no present anti-*Strongyloides* IgA antibodies in serum samples. Alcoholics had a positive correlation between anti-*Strongyloides* IgG and IC; anti-*Strongyloides* IgG and IgA and IC and anti-*Strongyloides* IgA. However, within non-alcoholic subjects no correlation was observed. The mean avidity index in serum samples was higher in alcoholics than in non-alcoholics. As for the avidity index, among the 11 alcoholic individuals with positive parasitological tests for *S. stercoralis* who also presented anti-*Strongyloides* IgG, 10 (90.9%) presented avidity index above 75%. **Conclusion:** Improvement of diagnostic methods are paramount to improve epidemiological studies and control measures in order to prevent strongyloidiasis, especially in immunocompromised patients. Based on this concept, the detection of anti-*Strongyloides* IgG antibodies, circulating immune complexes and determination of antibody avidity in serum samples have shown themselves as a potential alternative for an early diagnosis of strongyloidiasis in alcoholic individuals.

**Key-words:** *Strongyloides stercoralis*, alcoholics, immunodiagnostic, parasitological diagnostic.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Comparação entre Índice ELISA (IE) IgG anti-*Strongyloides*, imunocomplexos (IC) e IgA anti-*Strongyloides* em amostras de soro de indivíduos alcoolistas (n=70) e não alcoolistas (n=70). Linha tracejada indica o *cut-off* (IE = 1), considerou-se positivo quando IE > 1. As barras horizontais indicam a mediana e as verticais os intervalos interquartis. Cálculo estatístico entre os grupos realizado pelo teste de comparação de Mann Whitney (\* P<0,05). Os quadrados representam indivíduos com presença de *S. stercoralis* nos exames parasitológicos..... 54
- Figura 2 Correlação entre os níveis de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* e imunocomplexos (IC) em amostras de soro de indivíduos alcoolistas (A) (n=70) e não alcoolistas (B) (n=70). Índice ELISA (IE). Linhas tracejadas indicam o *cut-off* (IE = 1), considerou-se positivo quando IE > 1. Coeficiente de Correlação de Spearman ( $r_s$ ). Resultados positivos e negativos são indicados nos quadrantes correspondentes. Os círculos vazios representam indivíduos com presença de *S. stercoralis* nos exames parasitológicos..... 56
- Figura 3 Correlação entre os níveis de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* e IgA anti-*Strongyloides* em amostras de soro de indivíduos alcoolistas (A) (n=70) e não alcoolistas (B) (n=70). Índice ELISA (IE). Linhas tracejadas indicam o *cut-off* (IE = 1), considerou-se positivo quando IE > 1. Coeficiente de Correlação de Spearman ( $r_s$ ). Resultados positivos e negativos são indicados nos quadrantes correspondentes. Os círculos vazios representam indivíduos com presença de *S. stercoralis* nos exames parasitológicos..... 58
- Figura 4 Correlação entre os níveis de imunocomplexos (IC) e IgA anti-*Strongyloides* em amostras de soro de indivíduos alcoolistas (A) (n=70) e não alcoolistas (B) (n=70). Índice ELISA (IE). Linhas tracejadas indicam o *cut-off* (IE = 1), considerou-se positivo quando IE > 1. Coeficiente de Correlação de Spearman ( $r_s$ ). Resultados positivos e negativos são indicados nos quadrantes correspondentes. Os círculos vazios representam indivíduos com presença de *S. stercoralis* nos exames parasitológicos..... 60

Figura 5 Comparação do índice de avides (IA) entre indivíduos alcoolistas (n=39) e não alcoolistas (n=23), calculado no IA médio de duas diluições séricas (1/80; 1/160) com resultado positivo na titulação das amostras. Linha tracejada indica o limiar para diferenciação entre os grupos (IA>75% - alta avides). As barras horizontais indicam a média e as verticais o desvio padrão. Cálculo estatístico entre os grupos realizado pelo teste de *t* de *Student* (\* P<0,05). n: número de amostras analisadas. Os quadrados representam indivíduos com presença de *S. stercoralis* nos exames parasitológicos..... 61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos indivíduos alcoolistas (n=70) e não alcoolistas (n=70), de acordo com perfil sociodemográfico. Uberlândia-MG, Brasil, 2014-2015.....	48
Tabela 2	Distribuição da frequência de enteroparasitoses em indivíduos alcoolistas (n=70) e não alcoolistas (n=70). Uberlândia-MG, Brasil, 2014-2015.....	49
Tabela 3	Resultados dos exames parasitológicos pelos métodos de Cultura em Placa de Ágar e Hoffman, Pons e Janer no diagnóstico da estrogiloidíase humana em indivíduos alcoolistas (N=70). Uberlândia-MG, Brasil, 2014-2015.....	51
Tabela 4	Frequência de positividade da detecção de anticorpos IgG e IgA anti- <i>Strongyloides</i> e de imunocomplexos, em amostras de soro, entre indivíduos alcoolistas (n=70) e não alcoolistas (N=70). Uberlândia-MG, Brasil, 2014-2015.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUDIT	<i>Alcohol Use Disorder Identifications Test</i> (Teste de identificação de distúrbios do uso de álcool)
BOD	<i>Biochemical oxygen demand</i> (Demanda bioquímica de oxigênio)
CAGE	<i>Cut-Down, Annoyed by criticism, Guilty, Eye-opener</i>
CAPS-ad	Centro de Atenção Psicossocial Álcool e outras drogas
CEP-UFU	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia
CPA	Cultura em Placa de Ágar
<i>Cut-off</i>	Limiar de reatividade; ponto absoluto/ótimo de corte
DO	Densidade ótica
DO <sub>u+</sub>	Densidade ótica nos poços tratados com uréia
DO <sub>u-</sub>	Densidade ótica nos poços não tratados com uréia
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
ES	Extrato salino total
Fc	Fragmento cristalizável
g	Gravidade
HCU-UFU	Hospital das Clínicas de Uberlândia da Universidade Federal de Uberlândia
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
HPJ	Hoffman, Pons e Janer
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
IA	Índice de avidez
IC	Imunocomplexo
IE	Índice ELISA
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G

IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
L1	Larva rabditoide de primeiro estágio
L2	Larva rabditoide de segundo estágio
L3	Larva filarioide de terceiro estágio
L4	Larva filarioide de quarto estágio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Orto-fenilenodiamina
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfato contendo Tween 20
PBS-U+	PBS acrescido de 6M de uréia
pH	Ponto hidrogeniônico
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th	Linfócito T helper
T reg	Células T regulatórias
Tris-HCL	Solução de Tris (Hidroximetil) adicionada HCL
TX-114	Triton-X 114
Tween-20	Polioxietilensorbitano monolaurato
UAPS	Unidade de Atenção Primária à Saúde
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
v/v	Volume-volume

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.1 Aspectos morfológicos de <i>Strongyloides stercoralis</i></b> .....	16
<b>1.2 Aspectos biológicos e vias de transmissão de <i>Strongyloides stercoralis</i></b> .....	18
<b>1.3 Epidemiologia da estrogiloidíase humana</b> .....	19
<b>1.4 Manifestações clínicas da estrogiloidíase humana</b> .....	20
<b>1.5 Resposta Imune do hospedeiro ao <i>Strongyloides stercoralis</i></b> .....	22
<b>1.6 Diagnóstico da estrogiloidíase</b> .....	25
<b>1.7 Estrogiloidíase humana e Alcoolismo</b> .....	29
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	33
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	33
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	33
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	34
<b>3.1 Aspectos éticos</b> .....	34
<b>3.2 Locais de estudo</b> .....	34
<b>3.3 Seleção dos locais de estudo</b> .....	35
<b>3.4 Critérios de inclusão e seleção dos indivíduos</b> .....	36
<b>3.5 Instrumentos para coleta de dados</b> .....	38
<b>3.6 Aplicação do instrumento de coleta de dados e coleta de amostras para exames laboratoriais</b> .....	38
<b>3.7 Métodos de exames parasitológicos</b> .....	40
3.7.1 Método de Hoffmann, Pons e Janer (1934).....	40
3.7.2 Método de Cultura em placa de Ágar.....	40
<b>3.8 Produção da fração detergente obtida a partir do extrato salino de <i>Strongyloides venezuelensis</i></b> .....	41
3.8.1 Obtenção de Larvas filarioides de <i>S. venezuelensis</i> .....	41

3.8.2 Extrato salino total de <i>S. venezuelensis</i> .....	41
3.8.3 Fração detergente do extrato salino total.....	42
<b>3.9 Produção de soro imune em coelhos</b> .....	42
<b>3.10 Métodos imunológicos</b> .....	43
3.10.1 ELISA indireto para detecção de anticorpos IgG e IgA em amostras de soro.....	43
3.10.2 ELISA para detecção de imunocomplexos em amostras de soro.....	44
3.10.3 ELISA avidéz para detecção de IgG anti- <i>Strongyloides</i> em amostras de soro.....	44
<b>3.11 Análise estatística</b> .....	45
<b>3.12 Normas de biossegurança</b> .....	46
<b>4 RESULTADOS</b> .....	47
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	72
REFERÊNCIAS.....	73
APÊNDICE.....	98
ANEXOS.....	99



## 1 INTRODUÇÃO

A estrogiloidíase, causada pelo nematódeo *Strongyloides stercoralis* é uma parasitose negligenciada considerada um problema de saúde pública global (WHO, 2017). A baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos utilizados para o seu diagnóstico na rotina laboratorial, que não incluem métodos específicos para detecção de larvas, pode apresentar resultados falso-negativo e, conseqüentemente os dados sobre a incidência e prevalência da infecção são subestimados (BISOFFI et al., 2013; COSTA-CRUZ, 2016; MENDES et al., 2017). Essa parasitose apresenta distribuição mundial heterogênea com maiores prevalências em regiões tropicais e subtropicais. Estima-se que em todo mundo entre 30 e 100 milhões de pessoas encontram-se infectadas por *S. stercoralis* (SIDDIQUI; BERK, 2001; OLSEN et al., 2009; PAULA, COSTA-CRUZ, 2011; SCHÄR et al., 2013).

*Strongyloides stercoralis* apresenta ciclo evolutivo complexo, como também, a particularidade de desenvolver um ciclo de autoinfecção interna, o que pode contribuir para a gravidade desta helmintíase (COSTA-CRUZ, 2016). Geralmente causa infecções assintomáticas e crônicas em indivíduos imunocompetentes (GROVE, 1996), no entanto, a hiperinfecção e/ou doença disseminada ocorrem mais frequentemente em pacientes imunodeprimidos que apresentam resposta imune celular comprometida (MARCOS et al., 2011; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011; GONÇALVES et al., 2012a; McDONALD; MOORE, 2017).

O risco da infecção por *S. stercoralis* tem sido associado a grupos específicos de pacientes, tais como, os portadores do vírus linfotrópico humano (GOTUZZO et al., 1999; CHIEFFI et al., 2000; PORTO et al., 2002; CARVALHO; PORTO; 2004; HIRATA et al., 2006; FURTADO et al., 2013), indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH)/síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (CIMERMAN et al., 2002, 2006; PINLAOR et al., 2005; SILVA et al., 2005; GETANEH; MEDHIN; SHIMELIS, 2010; VASQUEZ GUILLAMET et al., 2017), portadores de doenças neoplásicas (GRAEFF-TEIXEIRA et al., 1997; MACHADO et al., 2008; VELOSO; PORTO; MORAES, 2008), pacientes transplantados (DULLEY et al., 2009; VILELA et al., 2009; FERREIRA et al., 2012; MAZHAR; ALI; AGUDELO HIGUITA, 2017) e alcoolistas (OLIVEIRA et al., 2002; ZAGO-GOMES et al., 2002; MARQUES et al., 2010; SILVA et al., 2016).

### 1.1 Aspectos morfológicos de *Strongyloides stercoralis*

As espécies do gênero *Strongyloides* pertencem ao reino Animalia, filo Nematoda, classe Secernentea, ordem Rhabdiasoidea, família Strongyloididae que é composta por parasitos de interesse médico e veterinário (BLAXTER et al., 1998). Há pelo menos 52 espécies descritas do gênero *Strongyloides*, entre elas apenas duas são consideradas infectantes para o homem: *S. stercoralis* (BAVAY, 1876) e *S. fuelleborni* (VON LINSTOW, 1905). A primeira espécie com distribuição mundial, também infecta cães, gatos e macacos, e a segunda parasita macacos e os casos de infecção em humanos foram encontrados na África e na Ásia (GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2016; THANCHOMNANG et al., 2017).

Seis formas evolutivas foram identificadas: fêmea partenogenética parasita, fêmea de vida livre, macho de vida livre, ovos, larvas rhabditoides e filarioides (GROVE, 1996; TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015; COSTA-CRUZ, 2016). A fêmea partenogenética apresenta corpo cilíndrico de aspecto filiforme. Mede em torno de 1,7 a 2,5 mm de comprimento e 0,03 a 0,04 mm de largura com extremidade anterior arredondada e a posterior afilada. Possui revestimento formado por uma cutícula fina e transparente, com estriações transversais. O aparelho digestivo é simples e formado por boca com três lábios, esôfago filariforme e longo (ocupando 25% do tamanho corporal) e orifício anal na extremidade posterior em posição transversal. A vulva ventral está posicionada no terço médio do corpo; dela, parte o útero anfidelfo; seguem-se ovários e ovidutos, com os ovos enfileirados em seu interior; estes órgãos formam o sistema reprodutor que ocupa até 2/3 do organismo (GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2016).

A fêmea de vida livre, menor que a fêmea partenogenética, é fusiforme e mede em torno de 0,8 a 1,2 mm de comprimento por 0,05 a 0,07 mm de largura. Possui cutícula fina, translúcida com finas estriações. Apresenta extremidade anterior arredondada e posterior afilada. Nessa forma evolutiva, o aparelho digestivo é simples, formado por boca contendo três lábios. Esôfago curto e dividido em três porções, uma anterior, cilíndrica e alongada, uma intermediária estreita e uma posterior globulosa (bulbo). Intestino simples e ânus próximo à extremidade posterior. O aparelho genital é organizado em vulva na região mediana do corpo. Útero anfidelfo, ocupando grande parte do corpo do helminto, ovários, ovidutos e receptáculo seminal (MORAES, 1948; GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2016).

O macho de vida livre possui corpo fusiforme e mede cerca de 0,07 mm de comprimento por 0,04 mm de largura. Apresenta extremidade anterior arredondada e posterior recurvada ventralmente. Tem revestimento similar ao das fêmeas. Boca trilabiada, esôfago

com morfologia análoga à da fêmea e intestino simples terminando em cloaca. A cauda é recurvada ventralmente e apresenta dois espículos copulatórios, sustentados pelo gubernáculo. A genitália é constituída pelos testículos, vesícula seminal e canais deferente e ejaculador (REY, 2001; TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015; COSTA-CRUZ, 2016).

As larvas rabditoides (L1 e L2) são os primeiros estádios larvais, medem em torno de 0,2 a 0,3 mm de comprimento por 0,015 mm de largura. As oriundas das fêmeas de vida livre ou parasita são semelhantes. Apresentam cutícula fina e hialina recobrimdo-as. Possuem vestíbulo bucal curto e esôfago rabditoide. O aparelho digestivo é continuado pelo intestino, que termina em abertura anal espaçada da extremidade posterior. Observa-se um primórdio genital desenvolvido e localizado no meio do corpo formado por agregado de células. Terminam em cauda pontiaguda, são encontradas nas fezes e nos fluidos intestinais, porém nas formas disseminadas são encontradas no escarro ou nos líquidos duodenal, pleural e liquor (REY, 2001; TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015; COSTA-CRUZ, 2016).

Após a segunda muda, as larvas diferenciam-se em L3, que são as larvas filarioides. As L3 são alongadas e finas e medem de 0,35 a 0,50 mm de comprimento por 0,01 a 0,03 mm de largura. Apresentam cutícula fina e hialina. A porção anterior é ligeiramente afilada e a posterior afina-se gradualmente terminando em duas pontas, conhecida como cauda entalhada. O vestíbulo bucal é curto, o esôfago filarioide e o intestino longo e estreito com ânus posterior. Dois tipos distintos de L3 são descritos, a larva infectante derivada dos ciclos direto ou indireto, vistas no meio ambiente e capaz de penetrar a pele ou mucosas; e a L3 autoinfectante que evolui no interior do hospedeiro, ocasionando os casos de autoinfecção interna (MORAES, 1948; LEVINE, 1979; REY, 2001; COSTA-CRUZ, 2016).

Ovos das fêmeas parasitas e de vida livre assemelham-se, com diferença apenas no tamanho, sendo os da última maiores. São elípticos, de parede translúcida que permite visualizar no momento da oviposição o embrião parcial ou totalmente desenvolvido (MORAES, 1948; GROVE, 1996). Normalmente os ovos não são observados nas fezes dos indivíduos, porém em alguns casos no qual o paciente apresenta diarreia grave eles podem ser visualizados (REY, 2001; TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015; COSTA-CRUZ, 2016).

## 1.2 Aspectos biológicos e vias de transmissão de *Strongyloides stercoralis*

As espécies de *Strongyloides* apresentam complexa biologia com dois ciclos de vida distintos: um direto ou partenogenético, e o indireto, sexuado ou de vida livre, ambos monoxêmicos (REY, 2001; THOMPSON et al., 2005; COSTA-CRUZ, 2016). As fêmeas parasitos podem produzir, simultaneamente, três tipos de ovos, dando origem a três tipos de larvas rabditoides (COSTA-CRUZ, 2016).

A transmissão desse parasito ocorre pela penetração ativa de larvas filarioides infectantes (L3) na pele íntegra, ou ocasionalmente, através da mucosa oral, esofágica e gástrica do hospedeiro por meio da ingestão de água e alimentos contaminados. Essas larvas secretam metaloproteases, enzimas que auxiliam, tanto na penetração quanto na migração através dos tecidos (GROVE, 1996; MARUYAMA et al., 2006). As larvas alcançam a circulação linfática e venosa, seguindo para coração e pulmão entrando nos alvéolos a partir dos capilares pulmonares, onde se transformam em larvas filarioides de estágio L4. Essas larvas atravessam o endotélio alveolar, migram pela árvore brônquica até a faringe, podem ser expelidas pela expectoração ou deglutidas, chegando ao intestino delgado, onde se diferenciam em fêmeas partenogenéticas que depositam poucos ovos por dia na mucosa intestinal. Esses ovos eclodem liberando larvas rabditoides que amadurecem, alcançam a luz intestinal e são liberadas com as fezes do hospedeiro, constituindo na forma diagnóstica (MORAES, 1948; PUTHIYAKUNNON et al., 2014; TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015; COSTA-CRUZ, 2016).

Dependendo das condições encontradas estas larvas desenvolverão o ciclo homogônico (direto) ou heterogônico (indireto) (MORAES, 1948). No ciclo homogônico, que é o mais simples, as larvas rabditoides alimentam-se da microbiota das fezes, aumentam de tamanho e em 24 horas diferenciam-se em larvas de segundo estágio e após dois dias atingem o estágio de L3 que não ingerem alimento. Estas larvas morrem em uma a duas semanas, a menos que infectem ou reinfectem o hospedeiro (MORAES, 1948; GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2016). No ciclo heterogônico, mais complexo, as larvas rabditoides sofrem quatro diferenciações no solo e após 18 a 24 horas, produzem fêmeas e machos de vida livre (MORAES, 1948; COSTA-CRUZ, 2016). O encontro dos adultos maduros favorece o acasalamento e na sequência ocorre a postura de ovos larvados, dos quais eclodem L1 que desenvolvem para L3 (YAMADA et al., 1991; THOMPSON et al., 2005; PUTHIYAKUNNON et al., 2014; TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015). Os

ciclos diretos e indiretos se completam pela penetração ativa de larvas L3 na pele ou em mucosa oral, esofágica ou gástrica do hospedeiro (COSTA-CRUZ, 2016).

Entre as infecções humanas causadas por nematódeos, *S. stercoralis* possui a habilidade de autoinfecção, tanto externa ou exógena quanto interna ou endógena. Na autoinfecção externa as larvas rabditoides presentes na região perianal de indivíduos infectados diferenciam-se em larvas filarioides infectantes e aí penetram, completando o ciclo direto, e na autoinfecção interna larvas rabditoides presentes na luz intestinal (íleo ou colon) de indivíduos infectados, diferenciam-se em larvas filarioides e ocorre invasão direta das larvas pela mucosa. Estes mecanismos são os principais responsáveis pela manutenção da doença, mesmo que não ocorram novas infecções (LIU; WELLER, 1993; GROVE, 1996; COSTA-CRUZ, 2016; NUTMAN, 2017). A autoinfecção interna pode provocar a elevação do número de parasitos de *S. stercoralis* no intestino e nos pulmões, quadro conhecido como hiperinfecção. O termo disseminação é utilizado para infecções nas quais parasitos são encontrados em sítios ectópicos, ou seja, quando as larvas migram para outros órgãos e sistemas (LIU; WELLER, 1993; RAMACHANDRAN et al., 1998; SIDDIQUI; BERK, 2001; SIEGEL; SIMON, 2012; SCHÄR et al., 2013; COSTA-CRUZ, 2016).

### 1.3 Epidemiologia da estrogiloidíase humana

O conhecimento das taxas de infecção por *S. stercoralis* regionalmente e globalmente, como também em grupos específicos de populações, é de alta importância epidemiológica e clínica, uma vez que indivíduos infectados apresentam alto risco de desenvolver quadro clínico de hiperinfecção e/ou disseminação da infecção quando a imunidade apresenta-se comprometida (REQUENA-MENDEZ et al., 2013; SCHÄR et al., 2013). De acordo com a prevalência, a estrogiloidíase é dividida em três categorias denominadas: casos esporádicos (prevalência <1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%) (PIRES; DREYER, 1993). Em áreas consideradas não endêmicas têm sido publicados casos isolados sobre a infecção por *S. stercoralis* e muitos desses casos se associam com quadros de imunossupressão (PUTHIYAKUNNON et al., 2014).

Maiores prevalências são observadas no Sudeste da África, na África Subsaariana, América Latina, oeste da Ásia, e em algumas regiões dos Estados Unidos da América (SCHÄR et al., 2013; PUTHIYAKUNNON et al., 2014). Estima-se que a infecção pelo *S. stercoralis* atinja de 10 a 40% da população em muitos países tropicais e subtropicais (SCHÄR et al., 2013; TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015; COSTA-CRUZ, 2016), e em

países com precárias condições sanitárias e socioeconômicas a taxa de infecção pode chegar a 60% (SCHÄR et al., 2013; COSTA-CRUZ, 2016). O número de casos da infecção pelo *S. stercoralis* vem aumentando em países desenvolvidos devido ao crescente número de imigrantes, viajantes, refugiados e veteranos de guerra (PUTHIYAKUNNON et al., 2014; TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015; BEKNAZAROVA; WHILEY, ROSS, 2016; OSTERA; BLUM, 2016; PAGE; SPEARE, 2016). Na Europa e nos Estados Unidos da América, a estrogiloidíase é frequente em trabalhadores do campo ou mineradores (SAMMET et al., 2013). Na África, a prevalência varia de 0,1% na África Central a 91,8% em Gabon (SCHÄR et al., 2013). Na Ásia, a prevalência tem sido estudada em vários países, com taxas alcançando 41% na população geral (KHIEU et al., 2014).

Na América Latina as taxas de prevalência da estrogiloidíase variam de 0,02% a 83,3% dependendo do grupo populacional e área de estudo (TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015). Países como Argentina, Equador, Venezuela, Peru e Brasil apresentaram áreas de alta prevalência (BUONFRATE et al., 2015). No Brasil, a estrogiloidíase tem importância na saúde pública, com prevalência de 5,5% na população geral, havendo uma variação de 3,9% a 7,9% entre as diferentes regiões do país (PAULA; COSTA-CRUZ, 2011). As variações na prevalência desta infecção se devem à diversos fatores, tais como, baixas condições sócio-econômicas, educacionais e inadequadas condições sanitárias e ambientais (MASCARINI-SERRA et al., 2010; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011).

Em Minas Gerais, na cidade de Uberlândia, a prevalência da infecção por *S. stercoralis* apresenta variações de acordo com a população estudada. Em crianças hospitalizadas a prevalência encontrada foi de 3,31% (PAULA et al., 2000); em pacientes diabéticos a prevalência foi de 3,8% (MENDONÇA et al., 2006) e em puérperas lactantes 4,4% (MOTA-FERREIRA et al., 2009). Maiores taxas de infecção foram encontradas em pacientes com câncer gastrointestinal (9,1%) (MACHADO et al., 2008), pacientes infectados por VIH/SIDA (12%) (SILVA et al., 2005), em escolares (13%) (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998) e em alcoolistas (33,3%) (OLIVEIRA et al., 2002).

#### **1.4 Manifestações clínicas da estrogiloidíase humana**

Há três possibilidades de evolução da infecção: erradicação (eliminação do parasito), cronicidade (resultante da manutenção do ciclo por longos períodos) e complicação (hiperinfecção e/ou disseminação) (GROVE, 1996; FARDET et al., 2007). Os sintomas e a evolução da doença são determinados pela interação entre o hospedeiro e o parasito (CORTI

et al., 2011) e por isso a manifestação da infecção pelo *S. stercoralis* está relacionada com a capacidade do sistema imunológico desenvolver ou não uma resposta imune contra o parasito, uma vez que a sintomatologia varia dependendo do grau de infecção (GROVE, 1996; TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015). Na maioria dos casos, os indivíduos infectados por *S. stercoralis* desenvolvem a forma crônica, que pode cursar de maneira assintomática (PORTO et al., 2002).

A estrogiloidíase possui diversas manifestações clínicas e os sinais e sintomas da infecção por *S. stercoralis* variam de acordo com a localização da infecção, com o número de larvas e se as larvas auto-infectantes carregam bactérias para locais extra-intestinais (PAGE; SPEARE, 2016). Sinais cutâneos, decorrentes da penetração de larvas infectantes na pele, como larva *migrans*, lesões maculopapulares e urticária são manifestações típicas (VADLAMUDI; CHI; KRISHNASWAMY, 2006; TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015; PAGE; SPEARE, 2016). Os sintomas pulmonares, quando presentes, são caracterizados por tosse com ou sem expectoração, dispnéia e crises asmáticas. Em casos graves pode ocorrer rompimento dos alvéolos devido à migração das larvas causando hemorragia e infiltrado inflamatório constituído de linfócitos e eosinófilos que podem ser limitados ou em casos mais graves, provocar a síndrome de Löeffler, edema pulmonar e insuficiência respiratória. As manifestações gastrointestinais mais frequentes incluem dor abdominal, diarreia e/ou constipação e vômitos (POCHINENI et al., 2015; TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015; PAGE; SPEARE, 2016). Em casos graves a presença de ovos, larvas e parasitos adultos na mucosa do intestino delgado podem resultar em reação inflamatória, podendo ocorrer ulcerações, síndrome de má absorção, diarreia crônica com perda proteica, hemorragia com desenvolvimento de quadros de hipoalbuminemia e anemias (GROVE, 1996; SIDDIQUI; BERK, 2001; BOULWARE et al., 2007; FARDET et al., 2007; JUCHEMS et al., 2008).

Em casos de imunossupressão, pode ocorrer aumento exacerbado da carga parasitária levando à síndrome de hiperinfecção e até mesmo a disseminação das larvas pelo corpo, sendo esta última associada a um mal prognóstico, uma vez que órgãos como o fígado e o sistema nervoso central podem ser invadidos pelo parasito (VADLAMUDI et al., 2006; MARCOS et al., 2008; ROXBY, GOTTLIEB, LIMAYE, 2009; BON et al., 2010). Na infecção disseminada as manifestações clínicas podem variar de acordo com os órgãos acometidos (KEISER; NUTMAN, 2004). Na hiperinfecção há exacerbção dos sinais pulmonares e gastrointestinais (YOSHIDA et al., 2006; MEJIA; NUTMAN, 2012).

O risco de sepse existe e pode ser desencadeado nos casos de hiperinfecção e/ou disseminação, uma vez que a penetração de grande número de larvas através da parede intestinal pode ser associada a organismos microbianos que estas carregam quando passam na corrente sanguínea (NEWBERRY et al., 2005; MEJIA; NUTMAN, 2012; REYES et al., 2017). Quando a integridade do sistema imune é severamente comprometida, a estrogiloidíase pode tornar-se uma doença fatal (MEJIA; NUTMAN, 2012).

### **1.5 Resposta imune do hospedeiro ao *Strongyloides stercoralis***

A longa permanência do parasito no hospedeiro humano (cronicidade) e a contínua passagem de larvas filarioides nos tecidos resultam em incessante exposição sistêmica aos antígenos parasitários. A maioria dos indivíduos desenvolve anticorpos das classes IgM, IgG, IgA e IgE específicos, sendo os anticorpos IgG os mais frequentemente detectados, permanecendo por longo tempo após a cura terapêutica (COSTA-CRUZ, 2016).

Anticorpos da classe IgM representam infecção recente e apresentam nível máximo uma semana após a infecção, embora os níveis mantenham-se elevados entre duas a três semanas após a infecção (GROVE, 1996; MARCOS et al., 2008). As imunoglobulinas da classe IgE se ligam aos receptores das células efectoras e podem induzir a desgranulação e liberação de mediadores de inflamação de mastócitos e basófilos, com conseqüente expulsão do helminto (ATKINS et al., 1999). Elevados níveis de IgE são encontrados em indivíduos imunocompetentes com diagnóstico de estrogiloidíase, porém em casos de hiperinfecção em indivíduos imunodeprimidos os níveis de IgE, total e específica, podem estar dentro do intervalo normal (RODRIGUES et al., 2007; MARCOS et al., 2008). IgG é a principal imunoglobulina do soro, correspondendo entre 70-75% do total de anticorpos séricos e podem ser detectados duas semanas após a infecção e podem permanecer até 20 semanas após a infecção (GROVE, 1996; LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014). As subclasses de IgG, IgG1 e IgG4, são as mais frequentemente detectadas. Sabe-se que existe um balanço entre a presença de IgE e IgG4, com níveis elevados de IgG4 em casos graves da doença e níveis de IgE dentro da normalidade (ATKINS et al., 1997 e 1999; RODRIGUES et al. 2007; COSTA-CRUZ, 2016). Assim, a estrogiloidíase crônica pode ser resultado da diminuição das respostas de hipersensibilidade (IgE-mediadas) para a persistente autoinfecção, com conseqüente redução dos efeitos imunopatológicos da anafilaxia constante (ATKINS et al., 1997).



Na estrogiloidíase, pelo fato do ciclo biológico do parasito apresentar o envolvimento de mucosas pulmonar e intestinal, o hospedeiro pode elaborar resposta local e sistêmica mediada por IgA (ATKINS et al., 1999; COSTA et al., 2003; MOTA-FERREIRA et al., 2009). Pacientes com sintomatologia grave tem redução significativa da concentração de IgA, que é o segundo anticorpo mais presente no soro e representa a classe mais proeminente nas mucosas e suas secreções (van EGMOND et al., 2001; COSTA et al., 2003; COSTA-CRUZ, 2016). A vida média da IgA sérica é de três a seis dias e seu catabolismo é relativamente mais rápido quando comparado à IgG (CORTHÉSY, 2007; BENCKERT et al., 2011). Esta imunoglobulina apresenta propriedades que facilitam a sua função na superfície das mucosas, entre elas, a polimerização e interação com uma proteína (componente secretor) que permite que a mesma tenha maior capacidade de ligar-se a antígenos e aglutiná-los (SANDERSON; WALKER, 1999; WOOF; KERR; 2006). Outra propriedade consiste na resistência à proteólise, uma vez que a IgA associada ao componente secretor forma a IgA secretora, uma molécula menos susceptível à digestão proteolítica no ambiente intestinal. Além disso, a IgA possui propriedade anti-inflamatória, que consiste na porção Fc da IgA, que é responsável por inibir as funções fagocíticas e líticas de neutrófilos e de células fagocíticas, como também, interfere na fixação de microorganismos às células epiteliais, mantendo-os na camada de muco, impedindo a colonização dos patógenos, sem induzir inflamação. A IgA também pode induzir efeitos inflamatórios, com ativação fagocítica pelo receptor Fc (SANDERSON; WALKER, 1999; van EGMOND et al., 2001; WOOF; KERR; 2006).

O equilíbrio entre resposta imune T-dependente com perfil Th-2 e T-independente desempenha um papel fundamental na resposta imune contra *S. stercoralis* (FINKELMAN et al., 1997). Independente da extensa complexidade dos organismos, na maioria dos casos as respostas imunes dos hospedeiros contra os parasitos são similares, sendo respostas T-dependentes com perfil Th-2, com a produção de citocinas, tais como as interleucinas-3 (IL-3), IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, resposta humoral mediada por IgE e resposta celular mediada por eosinófilos, basófilos e mastócitos (FERREIRA; COSTA-CRUZ, 2003; GAUSE; URBAN; STADECKER, 2003; NEGRÃO-CORRÊA; TEIXEIRA, 2006; RODRIGUES et al., 2009, ANURADHA et al., 2016). As IL-3 e IL-4 estimulam basófilos, como também, podem induzir o peristaltismo e a produção de muco que facilita a expulsão dos helmintos (ONAH; NAWA, 2000). As IL-4 e IL-13 modulam a produção de classes de imunoglobulinas pelas células B ativadas, resultando na maior liberação de IgE e IgG1 (ATKINS et al., 1999; MOTA-FERREIRA et al., 2009), interferem também na resposta

imune diretamente na fisiologia do intestino, aumentando o conteúdo de fluido no trato digestório. Este aumento de fluido é decorrente do aumento da permeabilidade intestinal e redução da absorção de líquidos (GOLDHILL et al., 1997). IL-5 é essencial para diferenciação, ativação de eosinófilos, e também na indução e produção de IgA; IL-6 promove a estimulação de granulócitos e de células B e T (FINKELMAN et al., 1997; COSTA-CRUZ, 2016). Respostas T-dependentes com perfil Th2 são essenciais para evitar hiperinfecção e disseminação de *S. stercoralis*, uma vez que, o declínio da resposta Th2 pode causar aumento da suscetibilidade à infecção em indivíduos coinfectados com conseqüente exacerbação da estrogiloidíase (GOTUZZO et al., 1999; PORTO et al., 2001; HIRATA et al., 2006; IRIEMENAM et al., 2010; TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015).

No organismo humano desenvolve-se resposta T-independente com produção de moléculas pró-inflamatórias inespecíficas, secretadas por macrófagos, entre elas o fator de necrose tumoral alfa e IL-1, os quais contribuem para a proliferação de células caliciformes e provocam aumento na secreção de muco, que reveste os parasitos e facilitam sua expulsão (MARUYAMA et al., 2000, NEGRÃO-CORRÊA, 2001; COSTA-CRUZ, 2016). Assim, proteínas do muco gastrointestinal, as mucinas, constituem uma barreira luminal que é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra helmintos. As mucinas são glicoproteínas poliméricas ricas em resíduos de aminoácidos que se ligam à sítios para oligossacarídeos presentes na superfície de parasitos, o que previne o estabelecimento na mucosa. No entanto, se o helminto atravessa a primeira linha de defesa ocorre a produção de citocinas inflamatórias e moléculas coestimulatórias pelas células dendríticas e macrófagos, que fazem parte da resposta imune inata (NEGRÃO-CORRÊA, 2001; MONCADA; KAMMANADIMINTI; CHADEE, 2003; KEREPESEI et al., 2007; LINDEN, et al., 2008). A IL-12 e a IL-18, citocinas produzidas primariamente pelos macrófagos e outras células acessórias, induzem a produção de interferon- $\gamma$  que favorece a proliferação e a ativação das células Th-1, modulando ou inibindo a resposta imune protetora dependente de Th2 (ARIZONO et al., 2007).

Além de estimular uma resposta tipicamente de perfil Th2, as infecções helmínticas são capazes de induzir populações de células T reguladoras (Treg) (WANG; CAO; SHI, 2008). Na estrogiloidíase, as Treg podem auxiliar no controle da morbidade, mas podem atuar na diminuição da resistência à infecção, conforme demonstrado em modelos animais (BLANKENHAUS et al., 2011). O aumento na população de Treg retardou a expulsão de *S. ratti* pela supressão de IL-9, ativadora de mastócitos (BLANKENHAUS et al., 2014); e, em humanos com estrogiloidíase, correlacionaram-se à diminuição dos níveis de IL-5,

importante na resposta eosinofílica e estavam associadas à diminuição de IgE em células adjacentes ao parasito (BARROS; MONTES, 2014).

Os eosinófilos são fundamentais para a resposta protetora contra helmintos (TRAJMAN; MacDONALD; ELIA, 1997; ARIZONO et al., 2007; FERREIRA et al., 2007; COSTA-CRUZ, 2016). São capazes de eliminar os parasitos por meio de proteínas catiônicas que são sintetizadas e estocadas em grânulos citoplasmáticos e são as responsáveis pelos maiores danos teciduais atribuídos aos eosinófilos. Após a ativação celular são secretados mediadores secundários, como, leucotrienos, fator ativador de plaqueta, prostaglandinas e citocinas, que provocam vasodilatação, aumento da secreção de muco e contração da musculatura lisa e consequentemente aumento da resposta imune inflamatória (KLION; NUTMAN, 2004; MACHADO et al., 2005; KEREPESI et al., 2007). A eosinofilia é mais frequente em pacientes infectados por *S. stercoralis* do que em outras infecções parasitárias (REPETTO et al., 2016).

## 1.6 Diagnóstico da estrogiloidíase

O diagnóstico clínico da estrogiloidíase pode ser suspeitado pelos sintomas e sinais clínicos, porém, torna-se necessário realizar exames específicos para confirmação da doença, particularmente nos casos assintomáticos (LIU, WELLER, 1993; PAGE; SPEARE, 2016). A sensibilidade dos métodos diagnósticos é influenciada pela fase da infecção, se aguda, crônica ou disseminada (TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015). Várias técnicas foram desenvolvidas com o objetivo de diagnosticar a estrogiloidíase, como testes parasitológicos, métodos imunológicos e técnicas de biologia molecular (LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014). Testes sorológicos são eficazes na detecção de anticorpos na fase crônica da doença, enquanto que os métodos parasitológicos possuem alta sensibilidade durante a fase aguda e disseminada da infecção (PAGE; SPEARE, 2016).

Os métodos de escolha para o diagnóstico definitivo da estrogiloidíase são os métodos parasitológicos, nos quais a confirmação dos parasitos deve ser realizada pela morfologia (TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015; PAGE; SPEARE, 2016). O exame parasitológico tem a finalidade de detectar formas evolutivas do parasito e várias técnicas foram descritas, tais como, método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917); Rugai (RUGAI; MATTOS; BRISOLA, 1954), Hoffman, Pons e Janer (1934); Faust, Sawitz e Tobie (1939); Ritchie (1948) e Cultura em Placa de Ágar (ARAKAKI et al., 1988). Entre elas, a cultura em placa de ágar demonstra maior sensibilidade e eficácia quando comparada aos

demais testes (SATO et al., 1995; KOBAYASHI et al., 1996; INTAPAN et al., 2005; INÊS et al., 2011; CAMPO-POLANCO; GUTIÉRREZ; ARIAS, 2014).

Métodos parasitológicos podem se tornar pouco confiáveis, uma vez que, na maioria dos casos, a carga parasitária é baixa e o padrão de excreção de larvas pode variar entre os níveis de infecção, além da eliminação não ser diária, o que torna necessário a coleta de amostras de fezes em dias alternados (DREYER et al., 1996; PAULA; COSTA-CRUZ, 2011; TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015; PAGE; SPEARE, 2016). Coletas repetidas de exames de fezes ao longo de dias consecutivos aumentam a sensibilidade em diagnosticar a infecção (SATO et al., 1995; SIDDIQUI; BERK, 2001; SUDRÉ et al., 2006; HIRATA, et al., 2007; SCHÄR et al., 2014).

Os parasitos adultos e larvas filarióides são raramente vistos nas fezes, porém ocasionalmente podem ser detectados em biopsias ou em fluidos de aspirado duodenal, pois habitam o interior do tecido intestinal (GOKA et al., 1990; REY, 2001; VALAR et al., 2007; KISHIMOTO et al., 2008; RIOS et al., 2015). Em pacientes com estrogiloidíase grave, larvas rabditóides ou filarióides de *S. stercoralis* podem ser detectadas por métodos que não fazem parte da rotina laboratorial, como, broncoscopia (UPADHYAY et al., 2001; VALAR et al., 2007; BASILE et al., 2010; WANG et al., 2013) e endoscopia (MITTAL; SAGI; HAWARI, 2009; KAKATI et al., 2011; WANG et al., 2013). Nesses casos também tem se observado a presença de larvas em fluidos brocoalveolar (CIRIONI et al. 1996; ZHAO; MALEKI, 2011), escarro (KIM et al., 2005) e fluido cérebro-espinhal (DUTCHER, et al., 1990; ONUIGBO; IBEACHUM, 1991).

A utilização de métodos de diagnóstico imunológico na rotina laboratorial tem sido útil para avaliação da resposta imune do hospedeiro e em estudos soropidemiológicos (FOGAÇA et al., 1990; SUDRÉ et al., 2006; COSTA-CRUZ, 2016). O aprimoramento desses métodos representa um avanço na determinação da infecção em grupos de risco, como pacientes imunocomprometidos (RIGO et al., 2008; PUTHIYAKUNNON et al., 2014). Dentre os métodos imunológicos podem ser utilizados: *enzyme linked-immunosorbent assay* (ELISA), para detectar anticorpos, antígenos e imunocomplexos no soro ou coproantígenos nas fezes; *immunoblotting*, considerado uma técnica altamente sensível e específica na identificação de proteínas imunodominantes de *Strongyloides* e reação de imunofluorescência indireta, direcionada para pesquisa de diferentes classes de imunoglobulinas no soro ou na saliva (LINDO et al., 1994; COSTA-CRUZ et al., 1997; RODRIGUES et al., 2007; RIGO et al., 2008; BON et al., 2010; FELICIANO et al., 2010; BOSQUI et al., 2015).

Tais métodos auxiliam no diagnóstico clínico, principalmente na avaliação da resposta imune em indivíduos assintomáticos, uma vez que apresentam maior sensibilidade quando comparados com os métodos parasitológicos (BOSCOLO et al., 2007; GONÇALVES et al., 2012b; LEVENHAGEM; COSTA-CRUZ, 2014). Dentre esses métodos, o teste ELISA utiliza como antígeno diferentes extratos de larvas filarioides, homólogas ou heterólogas. Amplamente utilizado por apresentar elevada sensibilidade e especificidade para pesquisa de anticorpos específicos do parasito, é considerado superior aos outros testes sorológicos no que se refere à praticidade, segurança e disponibilidade de reagentes (LIU; WELLER; 1993; SCHAFFEL et al., 2001; RODRIGUES et al., 2007; van DOOR et al., 2007; MOTA-FERREIRA et al., 2009; PUTHIYAKUNNON, et al., 2014).

Um dos desafios para o desenvolvimento de métodos baseados na detecção de anticorpos é a dificuldade em se obter quantidades suficientes de larvas filarioides de *S. stercoralis* para produção de extrato antigênico homólogo, devido a dificuldade de se manter a cepa, como também, o risco de infecção dos manipuladores do antígeno (COSTA-CRUZ et al., 1998; FELICIANO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2012a). Desta forma pesquisadores vêm utilizando antígenos heterólogos, como *Strongyloides ratti* e *Strongyloides venezuelensis*, como método alternativo no diagnóstico da estrogiloidíase humana (COSTA-CRUZ et al., 1998; SUDRÉ et al., 2006; MACHADO et al., 2008; RIGO et al., 2008, GONZAGA et al., 2011).

Espécies como *S. venezuelensis* que se desenvolvem em roedores, possuem determinantes antigênicos que apresentam reação cruzada com os antígenos de *S. stercoralis* (SATO et al., 1990; MACHADO et al., 2008; RIGO et al., 2008; FELICIANO et al., 2010), além disso, produz grande número de larvas infectantes em cultura de fezes de ratos experimentalmente infectados, simplificando a produção de antígenos, com a possibilidade de identificar fração antigênica única que pode ser reconhecida com precisão e especificidade por IgG específicas contra estrogiloidíase (GONÇALVES et al., 2008; MACHADO et al., 2008).

Desta forma, extratos antigênicos heterólogos são descritos no diagnóstico da estrogiloidíase humana (MACHADO et al., 2003; FELICIANO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2012b; BOSQUI et al., 2015). O que diferencia os vários métodos ELISA é técnica utilizada e a preparação antigênica usada em cada teste (TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015). O emprego do extrato salino total (RIBEIRO et al., 2010) e extrato alcalino (MACHADO et al., 2003) de larvas filarioides de *S. venezuelensis*, tem sido relatada na literatura. Frações purificadas do extrato bruto larval de *S. venezuelensis*

com Triton X-114 (TX-114), mostrou que a fração detergente do extrato salino apresentou alta especificidade, indicando fonte de peptídeos específicos para o imunodiagnóstico sorológico humano (FELICIANO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2010).

Níveis de anticorpos ainda não diferenciam totalmente infecção ativa de resultado sorológico falso positivo, como também, não é possível diferenciar casos com exames parasitológicos negativos para *S. stercoralis*, mas com resultados positivos em ensaios sorológicos (HIRA et al., 2004). Sendo assim, pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de melhorar o diagnóstico sorológico da estrogiloidíase (PUTHIYAKUNNON et al., 2014). Ensaio baseado na avididade de anticorpos IgG em amostras de soro definem o conjunto de forças de ligação entre um anticorpo e um antígeno (GUTIERREZ; MAROTO, 1996) e são utilizados como marcadores da fase de infecção. Durante infecções primárias, o estímulo antigênico, inicialmente, induz a produção de anticorpos de baixa avididade, e em casos crônicos ocorre produção de anticorpos específicos de alta avididade (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003). A determinação de avididade tem sido proposta como ferramenta complementar para detectar e discriminar infecção ativa em relação a casos suspeitos ou resultado sorológico falso positivo (GONZAGA et al., 2011; BOSQUI et al., 2017b), principalmente em casos em que a diferenciação de infecções recentes ou crônicas é necessária (DZIEMIAN et al., 2008).

A detecção de imunocomplexos (IC) em amostras de soro também tem se mostrado uma ferramenta diagnóstica indicada na estrogiloidíase, principalmente por demonstrar a infecção em atividade pela presença de antígenos complexados a anticorpos, sendo altamente relevante para detecção de doença parasitária, uma vez que, resultados positivos são indicativos de infecção. Imunocomplexos circulantes em amostra de soro parecem ser uma alternativa para o diagnóstico precoce da estrogiloidíase, principalmente em indivíduos imunossuprimidos (GONÇALVES et al., 2012b; BOSQUI et al., 2017a).

O método de diagnóstico molecular, como o *polymerase chain reaction*, permite a detecção do ácido desoxirribonucleico do parasito em amostras fecais sem o risco de reatividade cruzada com outros nematódeos ou patógenos. Apresenta sensibilidade e especificidade elevadas para o diagnóstico de *S. stercoralis* (KRAMME et al., 2011; SITTA et al., 2014; CHAVES et al., 2015; DACAL et al., 2018), pois permite o uso de antígeno recombinante de larva filarioide em reação imunoenzimática (RAVI et al., 2002; GHASEMIKHAH et al., 2017). No entanto, o método é aplicável apenas em situações de pesquisa (REPETTO et al., 2016). A avaliação de antígenos recombinantes, obtidos por tecnologia empregada em biologia molecular, tem demonstrado resultados de elevada

sensibilidade e especificidade quando empregados no imunodiagnóstico (COSTA-CRUZ, 2016; PAULA et al., 2016).

### **1.7 Estrongiloidíase humana e alcoolismo**

O uso abusivo do álcool é um problema de saúde pública em todo o mundo. No Brasil, entre as drogas lícitas e ilícitas, o uso de álcool configura-se como a principal substância psicoativa de consumo entre os usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2015) e seu uso está relacionado a mais de 200 tipos de doenças (WHO, 2014). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 16% da população mundial com mais de 15 anos fizeram uso de bebidas alcoólicas no ano de 2010; no ano de 2012, esta porcentagem foi estimada em 38%, e ao seu consumo foi atribuído 6% das mortes e 5% da carga global de doenças e lesões (WHO, 2014). No Brasil, há um aumento da prevalência de atendimentos relacionados ao uso do álcool quando comparado ao uso de outras substâncias psicoativas (BRASIL, 2015), e seu consumo representa um dos fatores de risco de maior impacto para mortalidade e morbidade no país (MELONI; LARANJEIRA, 2004). No ano de 2012, verificou-se que 50% da população brasileira acima de 18 anos haviam feito uso de bebida alcoólica, e que 10,5% dos homens e 3,6% das mulheres eram dependentes dessa substância (LARANJEIRA et al., 2014).

O uso excessivo de álcool leva à intoxicação crônica, o que pode ocasionar alteração na resposta imune inata e adaptativa (BARR et al., 2016) resultando em um estado de imunossupressão e, conseqüentemente, maior suscetibilidade às infecções por vários patógenos (MARQUES et al., 2010; MOLINA et al., 2010). O etanol modula a função dos monócitos e células dendríticas na resposta imune inata, inibindo a fagocitose e a produção de fatores de crescimento (BROWN et al., 2006; SIGGINS et al., 2009; SZABO; MANDREKAR, 2009; BARR et al., 2016). Alterações na permeabilidade intestinal (RAO et al., 2004) e nas funções do sistema respiratório (HOLGUIN et al., 1998; KERSHAW; GUIDOR, 2008) também são conseqüências do uso abusivo de álcool. O consumo crônico de etanol pode resultar em uma diminuição de células linfóides do sangue periférico, baço e timo associado à perda da função dos linfócitos, especialmente da resposta imune celular T-dependente, resultando em um aumento da incidência de infecções, principalmente infecções oportunistas (JERRELS et al., 1990; JERRELS, 1991; GHEORGHIU et al., 2004; SZABO; MANDREKAR, 2009). O alcoolismo também pode afetar vários tipos de células, incluindo neutrófilos, monócitos, macrófagos, porém o efeito nos linfócitos T é o fator que mais

contribuiu para a imunossupressão (GLASSMAN; BENNETT; RANDALL, 1985; BAGASRA et al., 1987).

O uso crônico de álcool pode causar alterações em todos os componentes da resposta imune adaptativa (PASALA; BARR; MESSAOUDI, 2015). A alteração na produção de algumas citocinas, como a IL-6, fator de necrose tumoral e IL-1 causam alterações no equilíbrio dessas citocinas e, conseqüentemente, um desequilíbrio na função das células imunes (COOK, 1998; LI et al., 2006). A IL-2 que é uma citocina que tem papel importante no crescimento e diferenciação das células T efectoras (BACHMANN; OXENIUS, 2007; MALEK et al., 2008), tem sua produção suprimida em pacientes alcoolistas, resultando em baixos níveis circulantes (VICENTE-GUTIÉRREZ et al., 1991). A supressão de IL-12 pode estar relacionada a uma diminuição da resposta imune com perfil Th1 e pode predispor o organismo a uma resposta imune com perfil Th2 (MOLINA et al., 2010). Embora o consumo crônico de álcool leve à redução do número de células B, em alcoolistas observa-se o aumento dos níveis de imunoglobulinas séricas (MILI et al., 1992; COOK, 1998; GONZALES-QUINTELA, 2008; PASALA; BARR; MESSAOUDI, 2015), tais como, nos níveis de IgA (MILI, et al., 1992; McMILLAN et al., 1997; GONZALES-QUINTELA et al., 2008), IgM (MILI et al., 1992) e de IgE (DOMINGUEZ-SANTALLA, 2001; GONZALES-QUINTELA et al., 2003). No entanto, alguns autores relatam que o consumo de álcool foi associado à diminuição da concentração de IgG e IgM (McMILLAN et al., 1997). Apesar do aumento de imunoglobulinas estar associado ao desenvolvimento de resposta imune específica, pacientes alcoolistas com elevados níveis de imunoglobulina são imunodeficientes, e isso pode ocorrer devido a uma regulação anormal dos níveis de anticorpos e/ou uma manifestação auto-imune (COOK, 1998).

O álcool leva à estimulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que por sua vez pode elevar a quantidade de hormônio corticosteróide, como o cortisol endógeno humano (ADINOFF et al., 1998; BADRICK et al., 2008; OBASI et al., 2015) e suprimir as funções da célula T (CHOUDHRY; LI; CHAUDRY, 2006; THAYER et al., 2006; SILVA et al., 2016). Estudos experimentais têm avaliado a relação entre consumo de álcool e corticosteroides e sugerem que níveis elevados deste hormônio levam ao aumento dos níveis de IL-18, que conseqüentemente contribuiu para alterações nas funções das barreiras intestinais, como aumento da permeabilidade intestinal (LI et al., 2006) e comprometimento da imunidade intestinal (CHOUDHRY; LI; CHAUDRY, 2006; LI et al., 2006). Esta desregulação no sistema imune induzida pelo uso de álcool torna os indivíduos mais susceptíveis a agentes infecciosos (MOLINA et al., 2010).



A associação entre alcoolismo e infecção por *S. stercoralis* tem sido relatada na literatura, com taxas de prevalência variando de 20,5% a 33,3% (OLIVEIRA et al., 2002; ZAGO-GOMES et al., 2002; MARQUES et al., 2010; SILVA et al., 2016). O uso crônico de álcool tem sido associado a uma maior predisposição à hiperinfecção e/ou disseminação da doença (OUDE LASHOF et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2010). Em um estudo foi relatado que a quantidade de álcool consumido seria proporcional ao aumento da frequência de infecção por *S. stercoralis*, com variação de 9,5% a 20,5% entre alcoolistas que ingerem de 60-150g de álcool por dia e alcoolistas que ingerem acima de 450g de álcool por dia, respectivamente (MARQUES et al., 2010).

Fatores relacionados às condições de vida dos pacientes alcoolistas, tais como, precárias condições de higiene, condições sanitárias inadequadas e mal nutrição, também podem estar relacionados ao aumento do risco de infecção (ZAGO-GOMES et al., 2002; MARQUES et al., 2010; BEKNAZAROVA; WHILEY; ROSS, 2016; SILVA et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2016). O risco de autoinfecção também pode ser associado aos efeitos do etanol nas proteínas da parede intestinal diminuindo a motilidade e permeabilidade intestinal, o que permite a maior permanência das larvas rabditoides no lúmen do intestino favorecendo assim a chance da sua maturação para larva filarioide (WEGENER et al., 1991; ADDOLORATO et al., 1997; COOK, 1998; MAIER et al., 1999; MARQUES et al., 2010).

A associação entre elevados níveis de cortisol endógeno humano e maior risco de estrogiloidíase tem sido relatada na literatura (FARDET et al., 2007), porém não há explicações sobre quais mecanismos estão envolvidos nesta relação entre estrogiloidíase grave e cortisol. Uma provável explicação seria a capacidade dos corticosteróides em deprimir tanto a produção de eosinófilos, como a ativação de linfócitos (TOLEDO; MUÑOZ-ANTOLI; ESTEBAN, 2015). Alguns autores sugerem que os metabólitos produzidos pelos corticosteroides se assemelham ao hormônio ecdisteróides do parasito. Este, por sua vez, regula a fertilidade da fêmea partenogênica de *S. stercoralis* e aumenta a transformação de larvas rabditoides em larvas filarioides infectantes, aumentando a taxa de autoinfecção (GENTA, 1992; REY, 2001; ZAGO-GOMES et al., 2002; MARCOS et al., 2011), desta forma níveis elevados de cortisol em alcoolistas infectados por *S. stercoralis* podem levar a uma alta carga parasitária (SILVA et al., 2016). Além disso, o aumento do cortisol endógeno humano, devido ao efeito do etanol sobre o eixo HPA, poderia ter um efeito direto sobre o parasito, ao suprimir as funções da célula T, aumentando a fecundidade e sobrevivência dos parasitos (CHOUDHRY; LI; CHAUDRY, 2006; THAYER et al., 2006; SILVA et al., 2016), possivelmente induzindo a autoinfecção e conseqüentemente a hiperinfecção (GENTA,

1992; KOTHARY; MUSKIE; MATHUR, 1999; REY, 2001). A imunossupressão induzida por corticosteróides também desencadeia a forma grave da doença em pacientes assintomáticos (FARDET et al., 2007).

O diagnóstico e tratamento precoce da infecção por *S. stercoralis* em indivíduos alcoolistas é essencial para a prevenção da hiperinfecção e disseminação da doença. Desta forma, a variabilidade de métodos diagnósticos com alta sensibilidade associada a diferentes tipos de amostras biológicas, como fezes e soro, podem garantir resultados confiáveis e serem úteis para estudos soropidemiológicos, assim como para o controle, prevenção e tratamento da estrogiloidíase, principalmente em pacientes imunodeprimidos, como os alcoolistas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Detectar anticorpos IgG e IgA anti-*Strongyloides* e imunocomplexos circulantes em amostras de soro de indivíduos alcoolistas e não alcoolistas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar a frequência da infecção por *S. stercoralis*, utilizando métodos parasitológicos (Cultura em Placa de Ágar e Hoffman, Pons e Janer) em amostras de fezes de indivíduos alcoolistas e não alcoolistas;
- Correlacionar a detecção de anticorpos IgG e IgA anti-*Strongyloides* e imunocomplexos em indivíduos alcoolistas e não alcoolistas;
- Verificar índices de avidéz de anticorpos IgG séricos anti-*Strongyloides* em indivíduos alcoolistas e não alcoolistas que apresentaram anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro;

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Aspectos éticos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (CEP-UFU), sob os números de protocolo 840.852 e 974.357 (Anexos A e B). Os indivíduos que aceitaram o convite para a participação assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo C) após receberem todas as informações e terem esclarecidas suas dúvidas sobre os procedimentos do estudo. Não há conflitos de interesse dos autores em relação a este estudo. Os indivíduos receberam os resultados dos exames de fezes e aqueles com infecção foram tratados para cada parasito, sem nenhum custo para os pacientes.

#### **3.2 Locais de estudo**

Este estudo transversal foi realizado avaliando-se pacientes atendidos no Centro de Atenção Psicossocial Álcool e Outras Drogas (CAPS-ad) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), no CAPS-ad da Secretaria Municipal de Saúde de Uberlândia e na Unidade de Atenção Primária à Saúde (UAPS) do bairro Custódio Pereira, localizados na zona urbana da cidade de Uberlândia, estado de Minas Gerais, região sudeste do Brasil. No ano de 2010, este município possuía população de 604.013 habitantes e índice de desenvolvimento humano de 0,789 (alto), de acordo com dados do censo populacional do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010) e do Atlas do Índice de Desenvolvimento Humano Municipal do Brasil (IDHMB, 2013), respectivamente. No ano de 2015, o município apresentava cobertura de 100% de atendimento urbano de água tratada e rede de esgoto, segundo dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS, 2016).

O CAPS-ad é um centro assistencial que faz parte do sistema de saúde mental onde são tratados pacientes portadores de dependência química. Funciona de segunda a sexta-feira nos turnos manhã, tarde e noite. Sua equipe de profissionais é composta por médicos clínicos, psiquiatras, psicólogos, assistentes sociais, enfermeiras, entre outros. Desse modo, os pacientes recebem tratamento integral às suas necessidades, podendo ainda serem internados no Hospital das Clínicas de Uberlândia da Universidade Federal de Uberlândia (HCU-UFU), quando necessário, para desintoxicação. No período em que o projeto deste estudo foi elaborado (ano de 2014), a cidade de Uberlândia possuía o CAPS-ad UFU e CAPS-ad da

Secretaria Municipal de Saúde de Uberlândia localizados nos bairros Luizote (setor oeste) e Umarama (setor leste), respectivamente. De acordo com os dados das secretarias destas instituições, o número de indivíduos cadastrados é superior ao número dos que realmente fazem parte da rotina de trabalho dos CAPS-ad, desta forma, durante segundo semestre do ano de 2013, cerca de 195 pessoas realizavam acompanhamento diário para tratamento de dependência química (álcool e outras drogas), porém somente cerca de 86 (44,1%) eram usuários somente de bebidas alcoólicas (45 pacientes CAPS-ad UFU e 41 pacientes do CAPS-ad Municipal).

As UAPS são portas de entrada ao SUS e o eixo coordenador dos pontos de atenção à saúde, articulados em rede, em que se supõe a integração à rede de serviços mais complexos (GIOVANELLA; MENDONÇA, 2008). Nelas, é possível receber atendimentos básicos em Pediatria, Ginecologia, Clínica Geral, Enfermagem e Odontologia. Os principais serviços oferecidos são consultas médicas, inalações, injeções, curativos, vacinas, coleta de exames laboratoriais, tratamento odontológico, encaminhamentos para especialidades e fornecimento de medicação básica. As UAPS desempenham um papel central na garantia de acesso à população de sua área de abrangência, garantindo atenção à saúde de qualidade. No ano de 2014, o município de Uberlândia possuía 49 UAPS distribuídas nos setores leste, oeste, norte, sul e central.

### **3.3 Seleção dos locais de estudo**

Com o objetivo de se obter a amostra para este estudo, composta por indivíduos alcoolistas e não alcoolistas, no início do mês de janeiro de 2014 foi realizada reunião com a coordenadora do CAPS-ad UFU e com diretores do ambulatório de traumatologia e ortopedia do HCU-UFU, locais onde inicialmente o estudo seria conduzido para formação do grupo de alcoolistas e não alcoolistas, respectivamente. Foi enviada solicitação de autorização ao diretor do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU, local de realização dos exames, para que os mesmos pudessem ser realizados. Após explicar todas as etapas e objetivos da pesquisa os responsáveis pelas unidades assinaram um Termo de Autorização (Anexo D, E e F). Este termo era um documento exigido pelo CEP-UFU para que o projeto deste estudo pudesse ser submetido para sua apreciação. Então, o projeto de pesquisa foi encaminhado ao CEP-UFU em fevereiro/2014 e o parecer final aprovando a realização desta pesquisa foi emitido em outubro/2014.

Após esta data, os coordenadores, cujas autorizações constavam no projeto deste estudo, foram novamente procurados para que autorizassem o início da coleta de dados, que deveria iniciar em novembro de 2014. Na época da coleta de dados percebeu-se que não seria possível a inclusão de pacientes do ambulatório de ortopedia. A dificuldade de se obter o número necessário de alcoolistas também foi observada no CAPS-ad UFU, devido a dificuldade de se conseguir a quantidade de amostras necessárias para a realização desta pesquisa. Desta forma, visando obter a casuística estipulada, as coordenadoras do CAPS-ad da Secretaria Municipal de Saúde e da Unidade de Atenção Primária a Saúde (UAPS) Custódio Pereira foram procuradas para que recebessem todas as informações sobre os objetivos e etapas da pesquisa. Ambas concordaram com a realização da coleta de dados em suas unidades e o Termo de Autorização (Anexos G e H) foi assinado por elas. Posteriormente, uma emenda foi enviada ao CEP-UFU em dezembro/2014 solicitando aprovação para inserir no projeto pacientes atendidos no CAPS-ad da Secretaria Municipal de Saúde de Uberlândia e na UAPS. O parecer final aprovando a emenda deste estudo foi emitido no início de março/2015. Após esta data, as coordenadoras, cujas autorizações constavam no projeto e na emenda deste estudo, foram novamente procuradas para que autorizassem o início da coleta de dados em suas unidades. Optou-se por realizar o estudo na UAPS do bairro Custódio Pereira, localizada no setor leste do município, pois os pacientes que consultavam nesta unidade apresentavam as mesmas características sociodemográficas dos indivíduos dos CAPS-ad.

### **3.4 Critérios de inclusão e seleção dos indivíduos**

Após a permissão das coordenadoras para o início da coleta de dados foi realizada uma reunião com os indivíduos alcoolistas que frequentavam e participavam da rotina de atendimento dos CAPS-ad com a finalidade de explicar os objetivos e etapas da pesquisa, como também, para conhecer a rotina dos pacientes daquelas Unidades. Considerando o número restrito de indivíduos que participavam da rotina de atendimentos dos CAPS-ad, optou-se por convidar todos os indivíduos alcoolistas para participar da pesquisa. Desta forma, para compor este grupo e serem incluídos neste estudo, os indivíduos deveriam ter 18 anos de idade ou mais, ser do sexo masculino e fazer consumo pesado de etanol (>60g/dia). Para confirmação ou exclusão do uso abusivo/dependência do álcool utilizaram-se questionários de rastreamento de abuso de álcool *Cut-Down, Annoyed by criticism, Guilty, Eye-opener* - CAGE (EWING, 1984) (Anexo I) e *Alcohol Use Disorder Identifications Test* -

AUDIT (BABOR et al., 2001) (Anexo J). Para evitar que os alcoolistas incluídos nesse estudo estivessem em períodos de abstinência muito diferentes estabeleceu-se que nenhum deles deveria estar abstinente por mais de 40 dias.

Não foram incluídos indivíduos que se recusassem a assinar o TCLE, aqueles com qualquer alteração mental que prejudicasse sua tomada de decisão e/ou os portadores de doença crônica debilitante, aqueles em uso de medicamentos imunossupressores e os portadores de cirrose hepática clinicamente evidente. Para afastar a possibilidade de cirrose hepática clinicamente evidente utilizaram-se critérios clínicos, laboratoriais e de imagens. A princípio não seriam incluídos os indivíduos que não realizassem exames parasitológicos de fezes com coleta de no mínimo três amostras de fezes, no entanto, posteriormente optou-se por incluir aqueles que coletaram apenas uma amostra de fezes, mas que esta foi positiva para *S. stercoralis*.

Com a finalidade de compor um grupo controle com número de indivíduos semelhante ao do grupo de alcoolistas, indivíduos que participavam do Grupo de Saúde do Homem na UAPS Custódio Pereira ou que aguardavam consulta na recepção da unidade foram convidados a participar desta pesquisa. Desta forma, realizou-se uma reunião com os pacientes do Grupo, e os que aguardavam na recepção foram abordados individualmente com o objetivo de esclarecê-los sobre as etapas e objetivos da pesquisa. Foram incluídos neste grupo indivíduos com 18 anos de idade ou mais, do sexo masculino e que não faziam consumo de risco de etanol. Para afastar a possibilidade do abuso de álcool entre eles, associou-se à história clínica os questionários de rastreamento de abuso de álcool, CAGE e AUDIT. Não foram incluídos indivíduos que se recusaram a assinar o TCLE, aqueles portadores de doença crônica debilitante e/ou em uso de medicamentos imunossupressores. Também não foram incluídos aqueles que não realizaram exames parasitológicos de fezes com coleta de no mínimo três amostras de fezes, no entanto, semelhante aos indivíduos alcoolistas, indivíduos não alcoolistas que apresentassem uma amostra de fezes positiva para *S. stercoralis* seriam incluídos no estudo.

Durante a coleta de dados, os indivíduos dos dois grupos foram abordados durante o período em que estavam nas instituições, em uma sala reservada disponibilizada pela coordenação de cada Unidade. Todos forneceram amostras de fezes e sangue para a realização de exames laboratoriais, conforme descrito no item 3.6. Os dois grupos deveriam apresentar as mesmas características socioeconômicas.

### **3.5 Instrumentos para coleta de dados**

Durante a coleta de dados foram utilizados três questionários. Primeiramente, foi aplicado um questionário para coleta de dados sociodemográficos (Apêndice A), elaborado pelos pesquisadores, com sete questões, com a finalidade de se obter a idade, renda mensal familiar em salários mínimos, escolaridade, tratamento de doença, uso de medicação, início do uso de bebida alcoólica e tempo de abstinência. Posteriormente, foram aplicados os questionários para rastreamento de abuso de álcool, CAGE e AUDIT (Anexos I e J).

O questionário CAGE é um instrumento de auto-relato (EWING, 1984), composto por quatro perguntas visando o rastreamento do uso excessivo/provável dependência de álcool. São considerados CAGE-positivo os entrevistados que responderem afirmativamente a pelo menos duas, das quatro questões. O questionário AUDIT foi desenvolvido em 1982 pela OMS (BABOR et al., 2001) para identificar os diferentes padrões de consumo alcoólico. É um instrumento com alta sensibilidade que avalia o uso de álcool nos últimos 12 meses. O AUDIT foi traduzido e validado para o português pela equipe do Programa de Ações Integradas para Prevenção e Atenção ao Uso de Álcool e Drogas na comunidade do Núcleo de Pesquisa em Psiquiatria Clínica e Psicopatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Composto por 10 questões, seu resultado permite avaliar o nível de consumo alcoólico do entrevistado e classificá-lo em: uso de baixo risco (pontuação de 0-7), uso de risco (pontuação de 8-15), uso nocivo (pontuação de 16-19) e provável dependência (pontuação de 20 ou mais).

### **3.6 Aplicação do instrumento de coleta de dados e coleta de amostras para exames laboratoriais**

Durante todo o período da coleta de dados (novembro/2014 a junho/2015), a doutoranda compareceu às Unidades de atendimento incluídas neste estudo para abordar e orientar os pacientes. Inicialmente, apresentava-se aos indivíduos convidados e esclarecia os objetivos e etapas da pesquisa, orientando que a participação era voluntária e anônima. Os instrumentos para coleta de dados foram aplicados individualmente em uma sala disponibilizada pelos coordenadores das unidades. As perguntas e opções de respostas foram lidas e marcadas pela doutoranda e os indivíduos respondiam verbalmente a cada item. Todos os pacientes tiveram a oportunidade de questionar em caso de dúvidas. O tempo médio gasto para aplicação dos questionários foi de 15 minutos.



Após aplicação dos questionários, foi disponibilizado aos indivíduos três recipientes para coleta de amostras de fezes, devidamente identificados. Eles foram orientados a coletar uma amostra de fezes por dia e que tais amostras não poderiam ser armazenadas em geladeira, pois teriam que ser analisadas no máximo em 6 horas após a coleta. As amostras deveriam ser deixadas nos CAPS-ad e na UAPS - Custódio Pereira, locais onde os pacientes estavam em atendimento, pois seriam recolhidas pela aluna. Visando facilitar a coleta das amostras, uma caixa de isopor, devidamente identificada, foi deixada em cada Unidade, para que os pacientes colocassem seus recipientes acondicionados. Nos casos em que o paciente não compareceu à Unidade para seu retorno ou acompanhamento médico, a doutoranda entrava em contato com os mesmos por telefone para combinar o melhor horário para realizar a busca ativa das amostras. Posteriormente, no final do período da manhã e quando necessário, no final do período da tarde, as caixas com as amostras de fezes foram coletadas e levadas ao Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses do Instituto de Ciências Biomédicas, UFU, onde foram realizados os exames parasitológicos pelos métodos de Hoffman, Pons e Janer (HPJ) e Cultura em Placa de Ágar (CPA). Os dois métodos foram realizados para cada uma das três amostras de fezes disponibilizadas pelos pacientes.

Após a coleta da terceira amostra de fezes, os pacientes foram convidados a realizar a coleta de sangue para os exames imunológicos. Aqueles que tiveram a primeira amostra de fezes com resultado positivo para *S. stercoralis* e não disponibilizaram mais amostras, também foram convidados a realizar os demais exames. Em uma sala de coleta de exames disponibilizada por cada Unidade, foi realizada a coleta de uma amostra de 5 ml de sangue, com material estéril, por meio de venopunção periférica e utilizando-se tubos a vácuo com gel separador e sem anticoagulante.

Todas as amostras foram transportadas, em caixa térmica, ao Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses do Instituto de Ciências Biomédicas, UFU, para preparo e armazenamento. As amostras de sangue foram centrifugadas a 350 x g por 10 minutos para obtenção do soro. O material obtido da centrifugação foi armazenado em duas alíquotas a -20°C até o momento do uso. As amostras de soro foram utilizadas para pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgA anti-*Strongyloides* e de imunocomplexos IgG.

### 3.7 Métodos de exames parasitológicos

#### 3.7.1 Método de Hoffmann, Pons e Janer (1934)

Aproximadamente 2 g de fezes de cada amostra foram colocadas em um *becker* com cerca de 5 ml de formol a 10% e homogeneizadas com bastão de vidro. Em seguida foi acrescentado 20 ml de água destilada, filtrando a suspensão resultante para um cálice cônico de 200 ml de capacidade, utilizando-se uma tela de náilon com cerca de 80 a 100 malhas por cm<sup>2</sup> com gaze cirúrgica dobrada em quatro. Os resíduos contidos na gaze foram lavados com 20 ml de água sob agitação constante em bastão de vidro, sendo o líquido da lavagem recolhido no mesmo cálice e completado para o volume de 200 mL de água. Esta suspensão de fezes permaneceu em repouso durante 24 horas. Ao final deste tempo, foi retirado o excesso de água e deixado somente um *pellet* com as fezes a serem observadas. Uma gota desse sedimento foi colocada em uma lâmina de microscopia e corada com lugol, coberto por uma lamínula (24 x 24 mm) e examinado em microscópio óptico (Olympus CH-2, Japão) em objetivas de 10 e 40x. Três lâminas foram preparadas referentes ao material colhido de cada paciente e analisadas por três examinadores.

#### 3.7.2 Método de Cultura em Placa de Ágar

O método de cultura em Placa de ágar foi realizado segundo Arakaki et al. (1988). Para a preparação das placas, utilizou-se o ágar bacteriológico (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brazil). Uma quantidade de 20 g do ágar foi medida e colocada em um frasco *erlenmeyer* de 2 L, em seguida foi adicionado 1 L de água destilada, a solução foi homogeneizada, o frasco foi vedado com papel pardo e fita adesiva e esterilizado em autoclave vertical (Fanem mod. 415, Guarulhos, SP, Brasil). Após esse procedimento, em uma cabine de fluxo laminar (Pachane mod. PA 040, Piracicaba, SP, Brasil), as placas de Petri foram preenchidas com aproximadamente 20 ml de ágar por placa. Posteriormente a solidificação do ágar, aproximadamente 2 g de fezes frescas de cada amostra foram distribuídas em cada placa de ágar (10 cm de diâmetro) em uma cabine de fluxo laminar. Em seguida as placas de ágar foram tampadas e seladas com fita adesiva, para prevenir uma infecção acidental, e permaneceram por 4 dias à temperatura de 27°C a 28°C em estufa *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) (TE 390, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). Após este período as placas foram examinadas a olho nu e em lupa, com o intuito de encontrar caminhos percorridos pelas

larvas, pois elas movem-se lentamente sobre o ágar, arrastando as enterobactérias, criando uma visível trilha na superfície dele. As placas com presença de caminhos foram consideradas positivas. Posteriormente a essa observação para confirmação da presença dos parasitos, a superfície do ágar das placas positivas foi lavada com formol 10%, o volume recolhido e examinado em microscópio óptico (Olympus CH-2, Japão) em objetiva de 10 e 40x para identificação das espécies. Três lâminas foram preparadas referentes ao material colhido de cada paciente e analisadas por três observadores diferentes

### **3.8 Produção da fração detergente obtida a partir do extrato salino de *Strongyloides venezuelensis***

#### 3.8.1 Obtenção de larvas filarioides de *S. venezuelensis*

As larvas filarioides (L3) utilizadas foram obtidas por coprocultura das fezes de ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* experimentalmente infectados com *S. venezuelensis*. As fezes coletadas foram mantidas em cultura de carvão animal, de acordo com Loos (IN: NEVES et al., 2016), por 3 dias a 28°C em estufa BOD (TE 390, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil), e recuperadas pelo método de Rugai, Matos e Brisola (1954). As L3 de *S. venezuelensis* depois de recuperadas e contadas foram mantidas a -20°C para produção das preparações antigênicas.

#### 3.8.2 Extrato salino total de *S. venezuelensis*

O extrato salino total foi produzido a partir de larvas L3 de *S. venezuelensis* de acordo com Gonzaga et al. (2011). Aproximadamente 300.000 larvas de *S. venezuelensis* foram ressuspendidas em 2 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,01 mol/L, pH 7,2) com adição de inibidores de protease (mini, ULTRA-completa, Roche, Mannheim, Alemanha) e rompidas em cinco ciclos de maceração manual com a utilização de nitrogênio líquido. A suspensão foi submetida a centrifugação a 12.400 x g a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante, extrato salino total (ES), foi quantificado pelo método de Lowry et al. (1951) e estocado a -20°C até o momento do uso.

### 3.8.3 Fração detergente do extrato salino total

Extrato salino total de *S. venezuelensis* foi submetido à separação de proteínas por meio do fracionamento com Triton X-114 (TX-114) (Sigma Chem. Co., EUA), de acordo com Feliciano et al. (2010). O processo de fracionamento partiu de uma massa protéica de 3 mg de ES na qual foi adicionada 600 µL de Tris (10 mM Tris-HCL, pH 7,4, 150 mM de NaCl) e 1% de TX-114. A solução foi homogeneizada e mantida em banho de gelo por 10 minutos (1ª etapa). Para separação das proteínas um gradiente de 6% de sacarose, 10 mM Tris-HCL, pH 7,4, 150 mM de NaCl e 0,06% de TX-114 foi adicionado, na proporção de 2:3 (v) e incubado a 37°C por 10 minutos (2ª etapa). A solução foi então centrifugada por 10 minutos a 3000 x g a 4°C (3ª etapa). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de fundo cônico e a fração mais densa (detergente) foi armazenada no mesmo tubo (4ª etapa). Ao sobrenadante obtido na 4ª etapa foi adicionado (1:1) Tris acrescido de 4% de TX-114. Esta solução foi homogeneizada e mantida em banho de gelo por 10 minutos, posteriormente a 37°C por 10 minutos, e centrifugada a 3000 x g a 4°C por 10 minutos (5ª etapa). O sobrenadante desta etapa constituiu a fração aquosa, sendo os sedimentos descartados. O sedimento obtido na 4ª etapa constituiu a fração detergente que foi precipitada em acetona PA (Merck, RJ, Brasil) na proporção de 1:2 (v/v), a 4°C por 18 horas e centrifugadas a 3000 x g a 4°C, por 30 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado ressuspendido em 300 µL de PBS. A dosagem proteica foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão de referência a soroalbumina bovina a 2000 µg (Sigma Chem. Co., EUA). A fração detergente foi estocada em aliquotas a -20°C até o momento de uso.

### 3.9 Produção de soro imune em coelhos

A IgG anti-*S. venezuelensis* purificada foi produzida e padronizada por Gonçalves et al. (2010). Para produção de anticorpo policlonal, dois coelhos machos da espécie *Oryctolagus cuniculus* foram imunizados com 500µg/mL de extrato alcalino de larvas filarioides de *S. venezuelensis* via subcutânea emulsificado com adjuvante completo de Freund na primeira imunização. A cada duas semanas após a primeira imunização, foi realizado um reforço, utilizando adjuvante sem *Mycobacterium* sp, adjuvante incompleto de Freund. Após três meses de acompanhamento, ao atingir o título ideal (1:20.000), amostras de sangue foram

coletadas e o soro obtido por centrifugação foi armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente para obtenção de gamaglobulina imune foi realizada a precipitação salina onde em 5 mL do anticorpo policlonal produzido em coelho, foi adicionado gota a gota 5 mL de solução de sulfato de amônio 3,12 M pH 6,5 em banho de gelo, sob agitação. Após 18 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  a solução foi centrifugada a  $3000 \times g$  por 30 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$  e o sedimento lavado três vezes em solução de sulfato de amônio 1,56 M pH 6,5, sob agitação. O sedimento foi dissolvido em solução de sulfato de amônio na metade do volume original e dialisado por 24 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  contra PBS com frequentes trocas de banho, após centrifugação a  $3000 \times g$  por 30 minutos, o sobrenadante foi armazenado à  $-20^{\circ}\text{C}$ . O conteúdo proteico do sobrenadante foi dosado pelo método de Lowry et al. (1951). A IgG anti-*S.venezuelensis* purificada foi utilizada para detecção de imunocomplexos em amostras de soro.

### 3.10 Métodos imunológicos

#### 3.10.1 ELISA indireto para detecção de anticorpos IgG e IgA em amostras de soro

A detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* foi conduzida de acordo com Feliciano et al. (2010) e a detecção de anticorpos IgA anti-*Strongyloides* foi conduzida de acordo com Ribeiro et al. (2010). Experimentos preliminares foram realizados para determinar as condições ideais para a concentração do antígeno, diluição do soro e conjugado. Placas de microtitulação de poliestireno (Greiner, Bio-one, Alemanha) de baixa afinidade foram sensibilizadas com 50  $\mu\text{L}$  de fração detergente de *S. venezuelensis* na concentração de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (0,06M, pH 9,6) e incubadas em câmara úmida por 18 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida as placas foram lavadas três vezes por 5 minutos em PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), bloqueadas com 50  $\mu\text{L}$  de PBS-T a 0,05% contendo leite desnatado a 3% e incubadas por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  em câmara úmida. As placas foram novamente lavadas três vezes por 5 minutos em PBS-T. Posteriormente, foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  por poço de amostra de soro na diluição de 1:80 para detecção de IgG e na diluição de 1:20 para detecção de IgA. Em todas as placas foram incluídas três amostras de soro padrão positivo e oito amostras de soro padrão negativos para IgG e IgA anti-*Strongyloides* como amostras de referência. Após incubação por 45 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  e três lavagens de 5 minutos com PBS-T foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de conjugado anti-IgG humana marcada com peroxidase (Sigma-Aldrich Co., EUA), na diluição de 1:2000 para detecção de IgG e 50  $\mu\text{L}$  de conjugado anti-IgA humana marcada com peroxidase (Sigma-Aldrich Co., St.

Louis, EUA), na diluição de 1:1000 para detecção de IgA. Após incubação de 45 minutos a 37°C, as placas foram lavadas três vezes por 5 minutos com PBS-T, e a reação foi revelada pela adição de 50 µL do substrato peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) e solução cromógena de orto-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA) preparado no momento do uso (10 mg de OPD + 25 mL de tampão citrato fosfato pH 5,0 + 10 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%). Após 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Os valores de densidade óptica (DO) foram determinadas a 492 nm em leitor de ELISA (Titertek Plus, Flow Laboratories, McLean, USA). Os resultados foram expressos em índice ELISA (IE) de acordo com o descrito no item 3.11.

### 3.10.2 ELISA para detecção de imunocomplexos em amostras de soro

A detecção de imunocomplexos foi conduzida de acordo com Gonçalves et al. (2012a). Placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning-Coastar, Laboratory Sciences Company, New York, NY) foram sensibilizadas com 50 µL de IgG anti *S. venezuelensis* produzida em coelhos na concentração de 40 µg/mL diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (0,06M, pH 9,6) e incubadas em câmara úmida por 18 horas a 4°C. Em seguida as placas foram lavadas 3 vezes em PBS-T por 5 minutos; a seguir foram adicionados 50 µL por poço de amostra de soro na diluição de 1:80 em PBS-T. Em todas as placas foram incluídas três amostras de soro padrão positivo e oito negativas para IgG anti-*S. stercoralis* como amostras de referência. Após incubação por 45 minutos a 37°C e três lavagens de 5 minutos com PBS-T foi adicionado 50 µL de conjugado anti-IgG humana marcada com peroxidase (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA), na diluição de 1:2000. Após incubação de 45 minutos a 37°C, as placas foram lavadas como descrito anteriormente e a reação foi revelada como descrito no item 3.10.1. Os valores de densidade óptica (DO) foram determinadas a 492 nm em leitor de ELISA (Titertek Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA). Os resultados foram expressos em índice ELISA (IE) de acordo com o descrito no item 3.11.

### 3.10.3 ELISA avidéz para detecção de IgG anti-*Strongyloides* em amostras de soro

As amostras utilizadas na avidéz foram definidas com base no resultado positivo de IgG (IE > 1,0), conforme item 3.10.1 totalizando 39 amostras de indivíduos alcoolistas e 23

amostras de indivíduos não alcoolistas. O ensaio de avidéz de anticorpos IgG foi conduzido de acordo com Gonzaga et al. (2011). As placas de microtitulação de baixa afinidade (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brazil) foram sensibilizadas com extrato salino (ES) diluído a uma concentração de 5 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato (0,06M, pH 9,6) e incubadas em câmara úmida por 18 horas a 4°C. A seguir foram lavadas, por três ciclos de cinco minutos cada, com PBS-T. As amostras de soro diluído em PBS-T (1:80, 1:160) foram adicionadas às placas em quadruplicata e incubadas por 45 minutos a 37°C. Em seguida, metade das amostras de soro foram tratadas com ureia (6 M) diluída em PBS (PBS-U+) e os poços restantes foram incubados com PBS-T, durante 10 minutos em temperatura ambiente, seguido por ciclo de lavagem como anteriormente mencionado. Subsequentemente, adicionou-se o conjugado enzima-anticorpo (anti IgG humana conjugada com peroxidase Fc específica, Sigma Chemical, EUA), na diluição de 1:2000 em PBS-T, e as placas foram incubadas por 45 minutos a 37°C. Após incubação, as placas foram lavadas e a reação foi revelada como descrito no item 3.10.1. Os valores de densidade óptica (DO) foram determinadas a 492 nm em leitor de ELISA (Titertek Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA). A média de cada duplicata forneceu resultados dos poços tratados com ureia (DO<sub>u+</sub>) ou sem ureia (DO<sub>u-</sub>). A avidéz dos anticorpos IgG para cada amostra foi calculada como o descrito no item 3.11.

### 3.11 Análise estatística

As variáveis foram analisadas com os testes específicos, paramétricos ou não paramétricos, segundo a distribuição dos dados. A significância estatística foi considerada com um valor de  $P < 0,05$ .

Os testes qui-quadrado e exato de Fisher foram utilizados para comparar o perfil sociodemográfico/econômico, as frequências dos testes parasitológicos e imunológicos positivos e os resultados positivos entre os métodos parasitológicos entre indivíduos alcoolistas e não alcoolistas.

O índice ELISA (IE) foi calculado segundo a fórmula,  $IE = DO \text{ amostra} / DO \text{ cut off}$ , sendo o *cut off* calculado pela média das DO obtidas das amostras de soro controles negativos ( $n = 8$ ; média da replicata nas placas testadas) acrescidas de 3 desvios padrões (SILVA et al., 2002). As amostras foram consideradas positivas quando  $IE > 1$ . O teste de Mann Whitney foi aplicado para comparar as medianas de IE IgG e IgA anti-*Strongyloides*, e de imunocomplexos entre indivíduos alcoolistas e não alcoolistas.

As correlações entre os níveis de anticorpos IgG e IgA anti-*Strongyloides*, e de imunocomplexos, foram determinadas utilizando o coeficiente de correlação de Sperman ( $r_s$ ).

O índice avidéz (IA) foi calculado considerando a fórmula:  $IA = (DO_{U+ \text{ diluição } x} / DO_{U- \text{ diluição } x}) \times 100\%$ . A avidéz de cada amostra foi apresentada como IA médio, interpretado a partir dos IA de cada diluição positiva (duas testadas - 1:80 e 1:160; IE > 1,0). Foi utilizada a fórmula:  $IA = (IA_{\text{diluição } 1:80} + IA_{\text{diluição } 1:160}) / 2$ . Valores definidos como baixa (IA < 75%) e alta avidéz (IA > 75%), seguiram o proposto por Gonzaga et al. (2011) para distinção de grupos/diagnóstico diferencial. O teste *t* de *Student* foi utilizado para comparar IA médio entre indivíduos alcoolistas e não alcoolistas.

Os dados foram analisados utilizando o programa computacional com pacotes estatísticos *GraphPad Prism* Versão 5.0 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, USA*).

### **3.12 Normas de biossegurança**

Todo o processo de coleta, manuseio dos materiais biológicos e reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo et al. (2005).



## 4 RESULTADOS

Inicialmente, foram convidados a participar deste estudo, 86 indivíduos alcoolistas, entre eles, 2 (2,3%) eram portadores de doença crônica e 14 (16,3%) coletaram apenas uma amostra de fezes, que foi negativa para o parasito *S. stercoralis*, portanto, eles não foram incluídos neste estudo.

Com a finalidade de compor um grupo controle com o mesmo número de indivíduos do grupo de alcoolistas, indivíduos não alcoolistas foram convidados a participar do estudo consecutivamente, conforme chegavam a UAPS, até se obter a mesma frequência de participação entre os dois grupos. Desta forma, 94 indivíduos não alcoolistas foram convidados a participar da pesquisa, entre eles, 3 (3,2%) eram usuários de corticoides, 16 (17,0%) coletaram apenas uma amostra de fezes, que foi negativa para o parasito *S. stercoralis* e 5 (5,3%) eram portadores de doença crônica, e por isso não foram incluídos no estudo. Houve a mesma frequência de participações entre os dois grupos, que foram divididos em: 70 indivíduos alcoolistas e 70 indivíduos não alcoolistas.

Não houve diferença significativa entre a média de idade dos alcoolistas [ $49,4 \pm 7,3$  (média  $\pm$  desvio padrão); intervalo 31-63 anos] e não alcoolistas [ $48,9 \pm 8,4$  (média  $\pm$  desvio padrão); intervalo 28-63 anos]. Nos dois grupos, os indivíduos participantes predominantemente apresentaram renda mensal familiar entre um a três salários mínimos e escolaridade de 5<sup>a</sup> a 8<sup>a</sup> série (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição dos indivíduos alcoolistas (n=70) e não alcoolistas (n=70), de acordo com perfil sociodemográfico. Uberlândia-MG, Brasil, 2014-2015.

Variáveis	Alcoolistas		Não alcoolistas		Valor de P*
	N	%	n	%	
<b>Faixa etária (anos)</b>					
28 ┆ 37	05	7,1	07	10,0	0,7641
38 ┆ 47	21	30,0	23	32,8	0,8555
48 ┆ 57	33	47,1	27	38,6	0,3932
58 ┆ 63	11	15,7	13	18,6	0,8226
<b>Renda mensal (Salário Mínimo)</b>					
≤ 1	22	31,4	19	27,1	0,7103
> 1 e ≤ 3	38	54,3	37	52,9	1,0000
> 3 e ≤ 5	10	14,3	14	20,0	0,5011
<b>Escolaridade</b>					
Analfabeto	02	2,9	02	2,9	1,0000
≤ 4 <sup>a</sup> série (fundamental)	18	25,7	20	28,6	0,8493
5 <sup>a</sup> a 8 <sup>a</sup> série (fundamental)	31	44,3	26	37,1	0,4914
1 <sup>o</sup> ao 3 <sup>o</sup> ano (ensino médio)**	16	22,8	19	27,1	0,6963
Ensino superior**	03	4,3	03	4,3	1,0000

\*teste qui-quadrado ou exato de Fisher; \*\*completo ou incompleto

A frequência da infecção por *S. stercoralis*, diagnosticada pelos métodos parasitológicos utilizados, foi maior entre indivíduos alcoolistas (17,1%) do que entre indivíduos não alcoolistas (1,4%). Não houve diferença estatística significativa na frequência de outros parasitos diagnosticados entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição da frequência de enteroparasitoses em indivíduos alcoolistas (n=70) e não alcoolistas (n=70). Uberlândia-MG, Brasil, 2014-2015.

Parasitos	Alcoolistas		Não alcoolistas		Valor de P*
	n	%	n	%	
<i>Strongyloides stercoralis</i> <sup>a/b</sup>	12	17,1	1	1,4	0,0022
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i> <sup>b</sup>	3	4,3	0	0	0,2446
<i>Enterobius vermicularis</i> <sup>b</sup>	0	0	1	1,4	1,0000
Ancilostomatídeos <sup>a/b</sup>	0	0	1	1,4	1,0000
<i>Hymenolepis nana</i> <sup>b</sup>	1	1,4	0	0	1,0000

n = frequência absoluta; % = porcentagem; \*teste exato de Fisher; <sup>a</sup> cultura em placa de ágar; <sup>b</sup> Hoffman, Pons e Janer.

Entre os 140 indivíduos alcoolistas e não alcoolistas, foram obtidas 418 amostras de fezes, pois um indivíduo alcoolista levou somente uma amostra de fezes. Pelo método de Cultura Placa de Ágar (CPA) observou-se a presença de caminhos em 28 placas de indivíduos alcoolistas e em duas placas de indivíduos não alcoolistas, os conteúdos das placas foram examinados por três diferentes examinadores, resultando em 90 lâminas de microscopia analisadas por esse método. Pelo método de Hoffman, Pons e Janer (HPJ) foram analisadas 1254 lâminas (418x3).

Entre os indivíduos alcoolistas, quando considerada a análise de três amostras de fezes, não houve diferença estatisticamente significativa na frequência do diagnóstico de estrogiloidíase entre os dois métodos utilizados. No entanto, quando considerado pacientes com no mínimo uma amostra de fezes positiva para *S. stercoralis* pelos métodos parasitológicos utilizados, a frequência de resultados positivos foi maior pelo método de CPA (82,3%) do que pelo método de HPJ (41,2%) (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados dos exames parasitológicos pelos métodos de Cultura em Placa de Ágar e Hoffman, Pons e Janer no diagnóstico da estrogiloidíase humana em indivíduos alcoolistas (N=70). Uberlândia-MG, Brasil, 2014-2015.

Alcoolistas	Métodos Parasitológicos					
	Cultura em Placa de Ágar			Hoffman, Pons e Janer		
	Amostras			Amostras		
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
1	+	+	+	-	-	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	-	-
4	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	-
6	+	+	+	-	-	-
7	+	+	+	-	-	-
8	-	+	+	-	-	+
9	-	+	+	-	-	+
10	-	-	+	-	-	-
11	-	-	+	-	-	+
12	+	NR	NR	+	NR	NR
13-70	-	-	-	-	-	-
Total [n (%)]	8 (11,4)	9 (12,9)	11 (15,7)	5 (7,1)	3 (4,3)	6 (8,6)
Número de pacientes com resultados positivos [n/N (%)]	12/70 (17,1) <sup>*</sup>			9/70 (12,9) <sup>*</sup>		
Número de amostras positivas [n/n <sup>b</sup> (%)]	28/34 (82,3) <sup>**</sup>			14/34 (41,2) <sup>**</sup>		

<sup>\*</sup>P=0,4777 teste qui-quadrado; <sup>\*\*</sup>P=0,0012 teste qui-quadrado; <sup>b</sup> número de amostras de fezes analisadas entre indivíduos com pelo menos uma amostra de fezes positiva em qualquer um dos dois métodos utilizados; n = frequência absoluta; % = porcentagem; NR: não realizado

Nas amostras de soro, as frequências de positividade de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* e de imunocomplexos foram maiores entre indivíduos alcoolistas do que entre indivíduos não alcoolistas. A detecção de anticorpos IgA anti-*Strongyloides* foi menor em indivíduos alcoolistas quando comparado aos não alcoolistas (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência de positividade da detecção de anticorpos IgG e IgA anti-*Strongyloides* e de imunocomplexos, em amostras de soro, entre indivíduos alcoolistas (n=70) e não alcoolistas (n=70). Uberlândia-MG, Brasil, 2014-2015.

	Alcoolistas		Não alcoolistas		Valor de P*
	n	%	n	%	
IgG anti- <i>Strongyloides</i> <sup>a</sup>	39	55,7	23	32,9	0,0104
Imunocomplexo <sup>a</sup>	27	38,6	12	17,1	0,0078
IgA anti- <i>Strongyloides</i> <sup>a</sup>	03	4,3	24	34,3	0,0001

n = frequência absoluta; % = porcentagem; \*teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher; <sup>a</sup> método ELISA.

Em amostras de soro, o valor da mediana dos resultados do índice ELISA (IE) em relação a IgG anti-*Strongyloides* entre alcoolistas (1,105) foi maior ( $U=1,542$ ;  $P=0,0002$ ) do que entre não alcoolistas (0,8283). O valor da mediana dos resultados do IE em relação ao imunocomplexo foi maior ( $U=1.505$ ;  $P=0,0001$ ) entre alcoolistas (0,9028) do que entre não alcoolistas (0,7262). O valor da mediana dos resultados do IE em relação a detecção de anticorpos IgA anti-*Strongyloides* foi menor ( $U=853,5$ ;  $P=0,0001$ ) em amostras de soro de indivíduos alcoolistas (0,5662) quando comparado aos não alcoolistas (0,8542). Entre os 12 indivíduos alcoolistas com exames parasitológicos positivos para *S. stercoralis*, 1 (8,3%) não apresentou anticorpos IgG anti-*Strongyloides*, 5 (41,7%) foram negativos para imunocomplexos e 9 (75,0%) não apresentaram anticorpos IgA anti-*Strongyloides* nas amostras de soro (Figura 1).

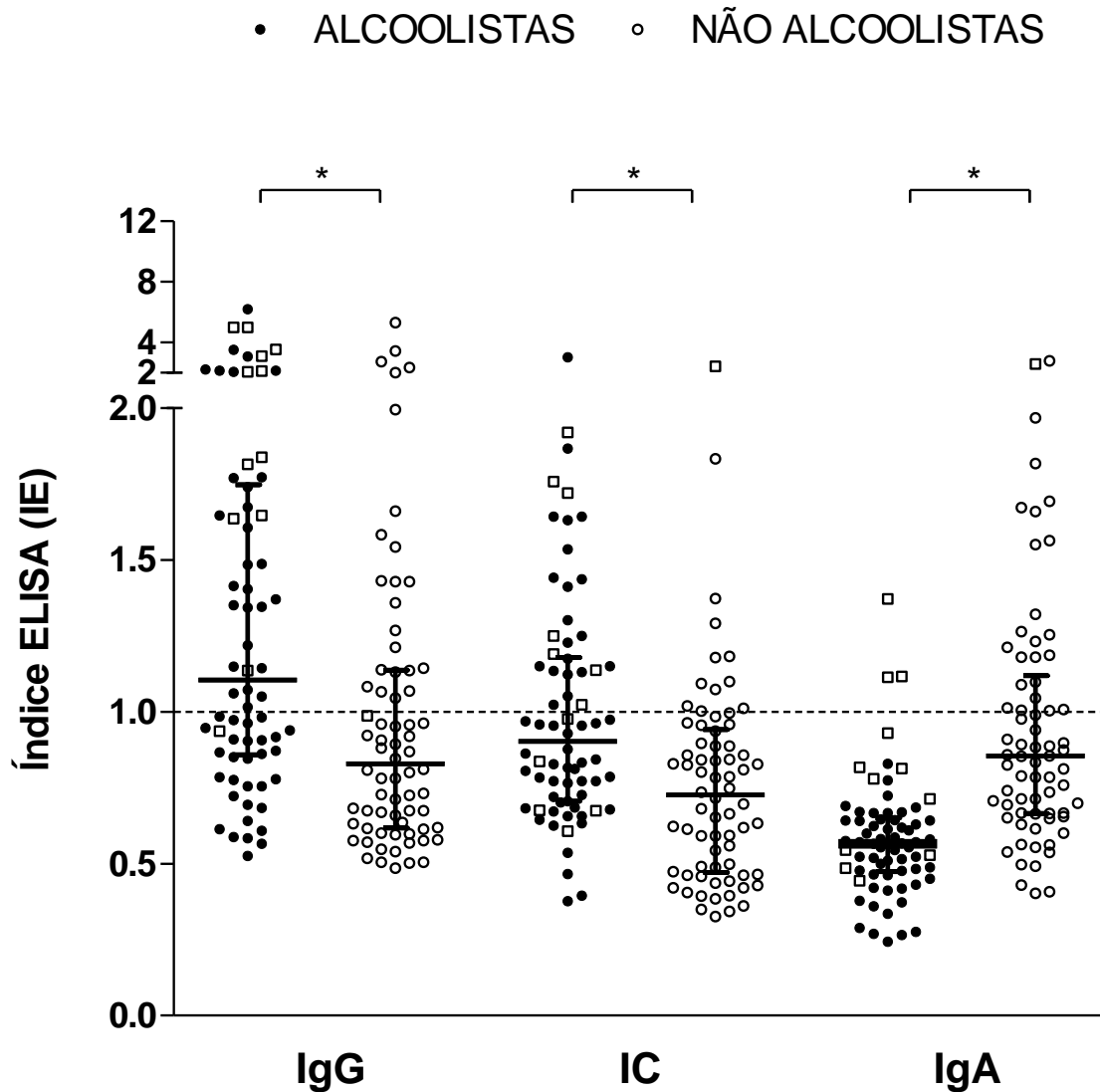
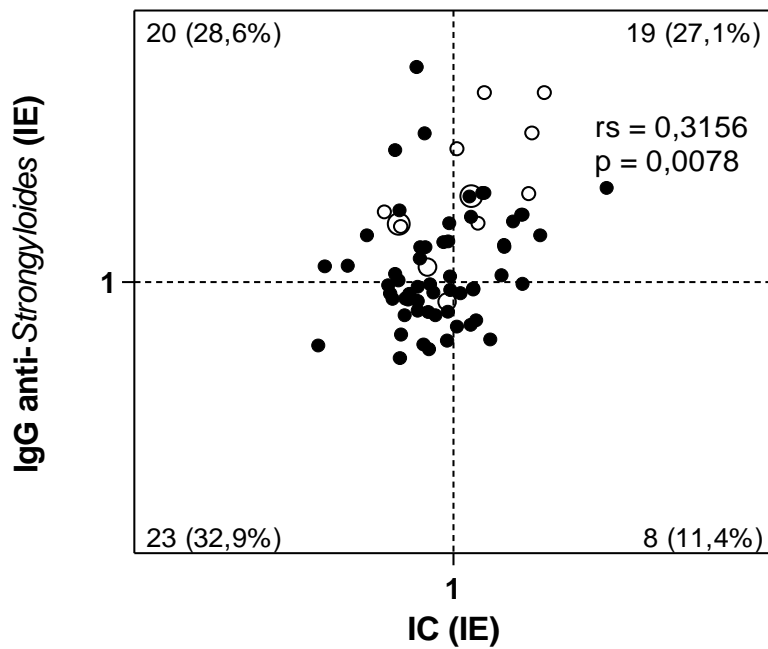


Figura 1. Comparação entre Índice ELISA (IE) IgG anti-*Strongyloides*, imunocomplexos (IC) e IgA anti-*Strongyloides* em amostras de soro de indivíduos alcoolistas (n=70) e não alcoolistas (n=70). Linha tracejada indica o *cut-off* (IE = 1), considerou-se positivo quando IE > 1. As barras horizontais indicam a mediana e as verticais os intervalos interquartis. Cálculo de diferença estatística entre os grupos realizado pelo teste de comparação de Mann Whitney (\* P<0,05). Os quadrados representam indivíduos com presença de *S. stercoralis* nos exames parasitológicos.



Indivíduos alcoolistas apresentaram correlação positiva entre os níveis de IgG anti-*Strongyloides* e imunocomplexos ( $r_s=0,3156$ ;  $P=0,0078$ ). Entre os 12 indivíduos alcoolistas com exames parasitológicos positivos para *S. stercoralis*, 7 (58,3%) apresentaram resultados duplo positivo (IgG+/IC+) nos ensaios sorológicos, 4 (33,3%) foram positivos somente para IgG anti-*Strongyloides* e 1 (8,3%) foi negativo nos dois testes sorológicos (IgG-/IC-) (Figura 2A). Entre os indivíduos não alcoolistas não houve correlação positiva entre os níveis de IgG anti-*Strongyloides* e imunocomplexos ( $r_s= -0,1523$ ;  $P=0,2082$ ), e o indivíduo com exames parasitológicos positivos para *S. stercoralis* não apresentou anticorpos IgG anti-*Strongyloides* e foi positivo para imunocomplexos (Figura 2B).

A.



B.

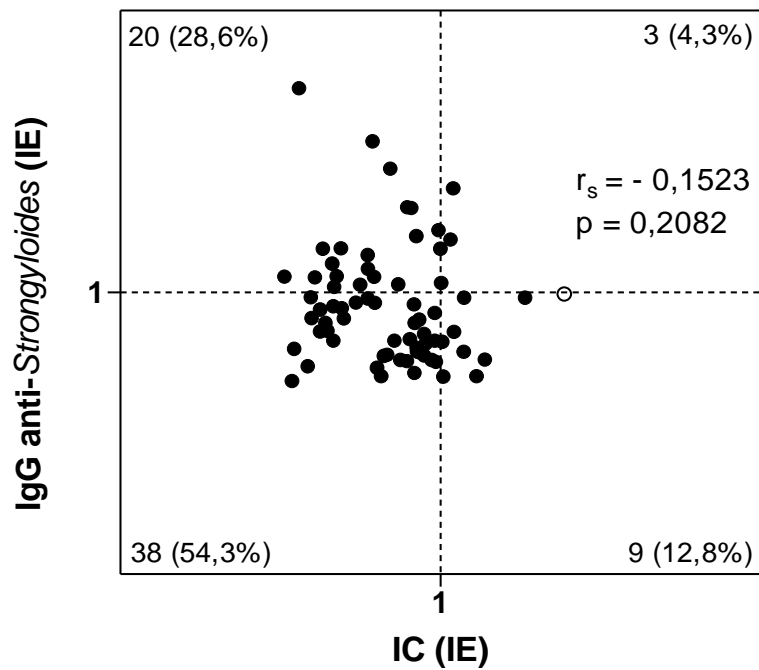
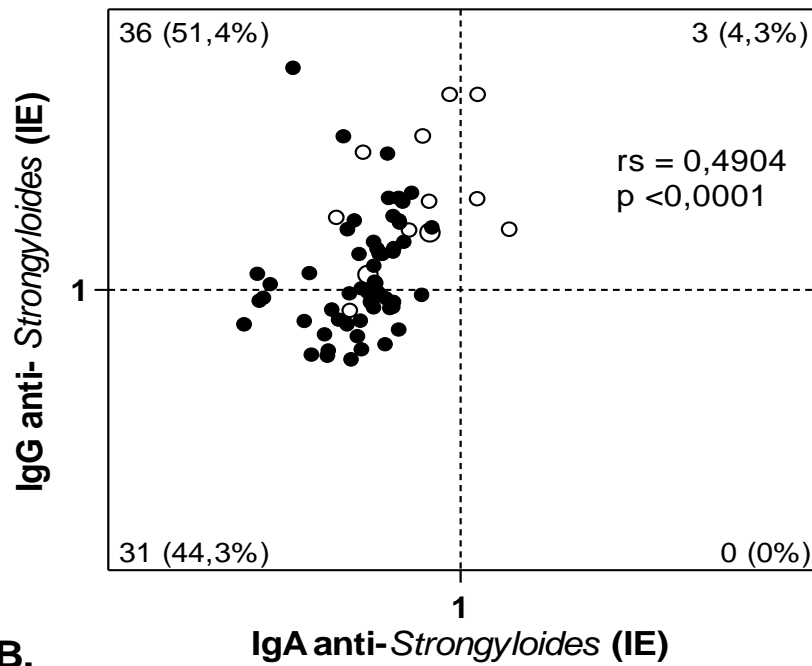


Figura 2. Correlação entre os níveis de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* e imunocomplexos (IC) em amostras de soro de indivíduos alcoolistas (A) (n=70) e não alcoolistas (B) (n=70). Índice ELISA (IE). Linhas tracejadas indicam o *cut-off* (IE = 1), considerou-se positivo quando IE > 1. Coeficiente de Correlação de Spearman ( $r_s$ ). Resultados positivos e negativos são indicados nos quadrantes correspondentes. Os círculos vazios representam indivíduos com presença de *S. stercoralis* nos exames parasitológicos.

Indivíduos alcoolistas apresentaram correlação positiva entre os níveis de IgG anti-*Strongyloides* e IgA anti-*Strongyloides* ( $r_s=0,4904$ ;  $P<0,0001$ ). Entre os 12 indivíduos alcoolistas com exames parasitológicos positivos para *S. stercoralis*, 3 (25,0 %) apresentaram resultados duplo positivo (IgG+/IgA+) nos ensaios sorológicos, 8 (66,7%) foram positivos somente para IgG anti-*Strongyloides* e 1 (8,3%) foi negativo nos dois testes sorológicos (IgG-/IgA-) (Figura 3A).

Entre os indivíduos não alcoolistas não houve correlação positiva entre os níveis de IgG e IgA anti-*Strongyloides* ( $r_s= -0,01766$ ;  $P=0,8846$ ), e o indivíduo com exames parasitológicos positivos para *S. stercoralis* não apresentou anticorpos IgG anti-*Strongyloides*, porém apresentou anticorpos IgA anti-*Strongyloides* (Figura 3B).

A.



B.

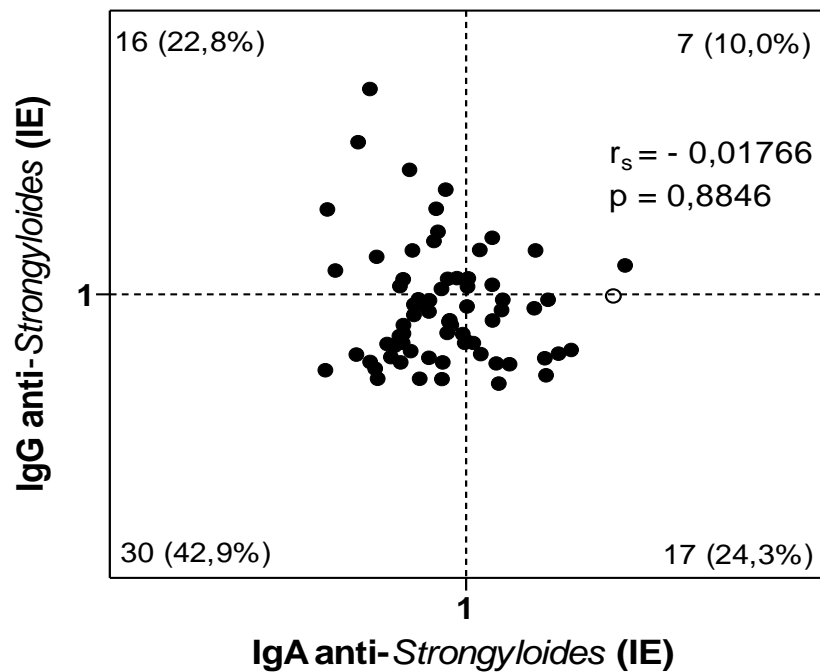
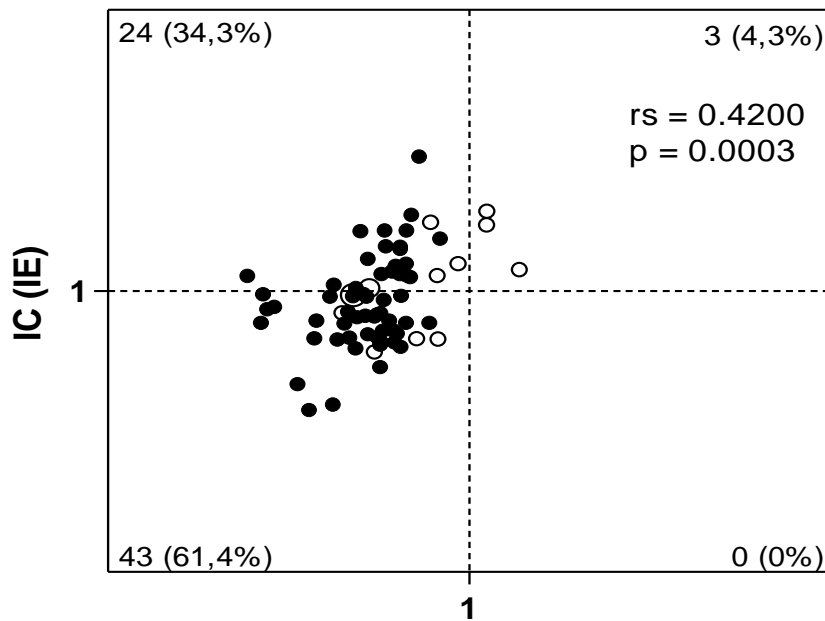


Figura 3. Correlação entre os níveis de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* e IgA anti-*Strongyloides* em amostras de soro de indivíduos alcoolistas (A) (n=70) e não alcoolistas (B) (n=70). Índice ELISA (IE). Linhas tracejadas indicam o *cut-off* (IE = 1), considerou-se positivo quando IE > 1. Coeficiente de Correlação de Spearman ( $r_s$ ). Resultados positivos e negativos são indicados nos quadrantes correspondentes. Os círculos vazios representam indivíduos com presença de *S. stercoralis* nos exames parasitológicos.

Os indivíduos alcoolistas também apresentaram correlação positiva entre os níveis de imunocomplexos e IgA anti-*Strongyloides* ( $r_s=0,4200$ ;  $P=0,0003$ ). Entre os 12 indivíduos alcoolistas com exames parasitológicos positivos para *S. stercoralis*, 3 (25,0%) apresentaram resultados duplo positivo (IC+/IgA+) nos ensaios sorológicos, 4 (33,3%) foram positivos somente para imunocomplexos e 5 (41,7%) foram negativos nos dois testes sorológicos (IC-/IgA-) (Figura 4A).

Entre os indivíduos não alcoolistas não houve correlação positiva entre os níveis de imunocomplexos e IgA anti-*Strongyloides* ( $r_s=0,1038$ ;  $P=0,3926$ ), e o indivíduo com exames parasitológicos positivos para *S. stercoralis* foi duplo positivo (IC+/IgA+) nos ensaios sorológicos (Figura 4B).

A.



B.

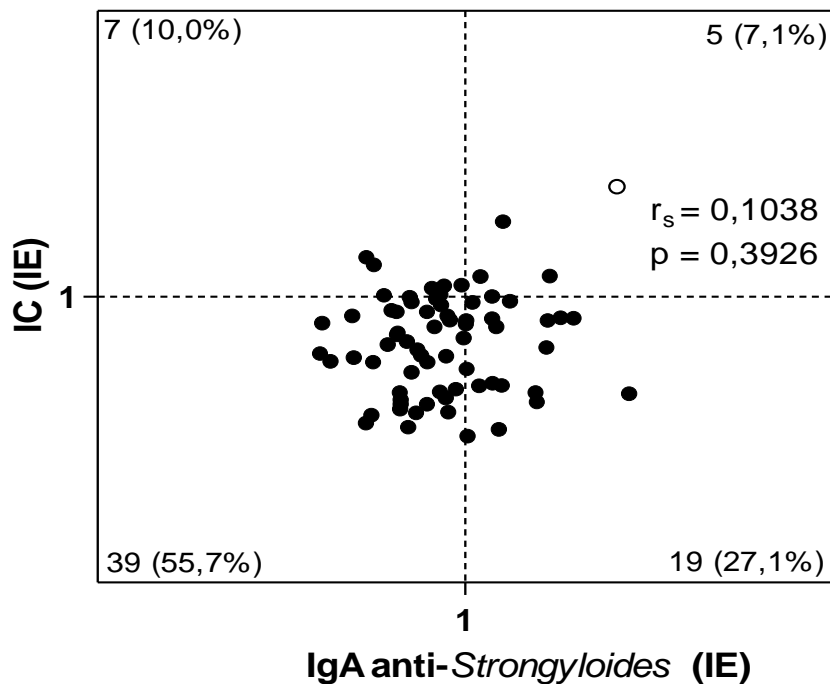


Figura 4. Correlação entre os níveis de imunocomplexos (IC) e IgA anti-*Strongyloides* em amostras de soro de indivíduos alcoolistas (A) (n=70) e não alcoolistas (B) (n=70). Índice ELISA (IE). Linhas tracejadas indicam o *cut-off* (IE = 1), considerou-se positivo quando IE > 1. Coeficiente de Correlação de Spearman ( $r_s$ ). Resultados positivos e negativos são indicados nos quadrantes correspondentes. Os círculos vazios representam indivíduos com presença de *S. stercoralis* nos exames parasitológicos.

A média ( $\pm$  desvio padrão) do índice de avidéz (IA) médio entre alcoolistas ( $83,65 \pm 8,90$ ) foi maior ( $P=0,0006$ ) do que entre não alcoolistas ( $74,60 \pm 10,41$ ). Entre os 11 indivíduos alcoolistas com exames parasitológicos positivos para *S. stercoralis* e que apresentaram anticorpos IgG anti-*Strongyloides*, 10 (90,9%) apresentam índice de avidéz acima de 75% (Figura 5).

● ALCOOLISTAS      ○ NÃO ALCOOLISTAS

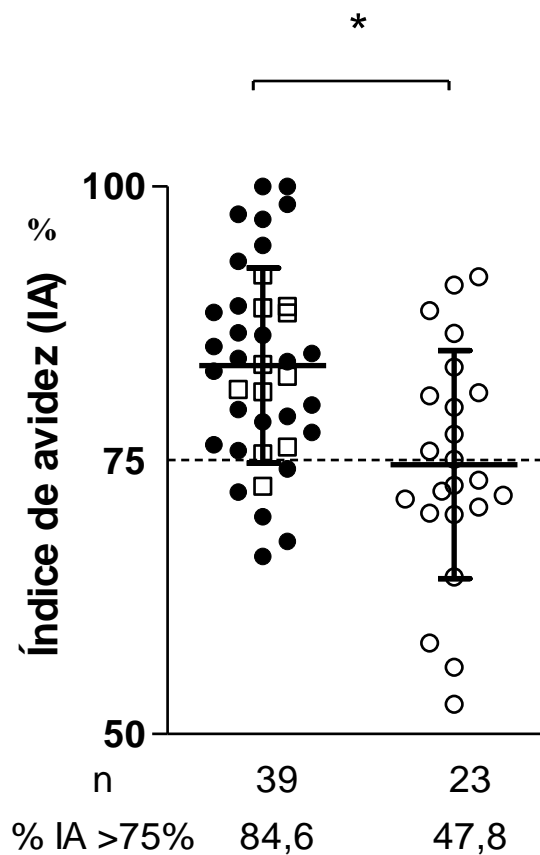


Figura 5. Comparação do índice de avidéz (IA) entre indivíduos alcoolistas (n=39) e não alcoolistas (n=23), calculado no IA médio de duas diluições séricas (1/80; 1/160) com resultado positivo na titulação das amostras. Linha tracejada indica o limiar para diferenciação entre os grupos (IA>75% - alta avidéz). As barras horizontais indicam a média e as verticais o desvio padrão. Cálculo estatístico entre os grupos realizado pelo teste de *t* de Student (\*  $P<0,05$ ). n: número de amostras analisadas. Os quadrados representam indivíduos com presença de *S. stercoralis* nos exames parasitológicos.

## 5 DISCUSSÃO

O conhecimento das taxas de infecção por *S. stercoralis* nos âmbitos nacionais, regionais e em populações de risco é mais relevante clínica e epidemiologicamente do que as estimativas de prevalência global (SCHÄR et al., 2013). Neste sentido, além do aspecto epidemiológico da estrogiloidíase, faz-se necessária a elucidação do perfil/resposta imunológica de pacientes pertencentes aos grupos considerados de risco, entre eles, os alcoolistas. O alcoolismo crônico tem sido associado à uma maior predisposição à infecção, hiperinfecção e/ou disseminação da estrogiloidíase (OUDE LASHOF et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2010).

No presente estudo foram avaliados indivíduos alcoolistas e não alcoolistas que apresentaram semelhante perfil socioeconômico, tais como, faixa etária, renda mensal familiar e escolaridade, uma vez que tais fatores podem influenciar na predisposição a adquirir a infecção pelo *S. stercoralis*. Para este estudo, como há poucas mulheres alcoolistas em tratamento nos CAPS-ad optou-se por convidar a participar da pesquisa apenas indivíduos do sexo masculino, uma vez que homens e mulheres apresentam tolerância diferente ao uso de álcool. O organismo feminino pode ser mais susceptível aos efeitos deletérios do álcool devido a fatores, tais como, menores níveis das enzimas metabolizadoras do álcool no estômago (álcool desidrogenase) e menor quantidade de água corpórea, o que diluiria menos o álcool ingerido (MASTERS, 2003; OGA, 2003). Consequentemente, homens e mulheres poderiam ter influência do álcool de formas diferentes sobre o sistema imunológico e isso representaria um viés no estudo. Além disso, é descrito que a concentração de imunoglobulinas no soro pode variar de acordo com o sexo (GONZALES-QUINTELA et al., 2008). Também não foi aplicado qualquer teste para avaliar o estado imunológico dos pacientes avaliados, pois o interesse era conhecer a validade dos testes sorológicos utilizados neste estudo para a avaliação dos pacientes alcoolistas que habitualmente procuram por atendimento de saúde.

A média de idade dos indivíduos alcoolistas e não alcoolistas foi de  $49,4 \pm 7,3$  e  $48,9 \pm 8,4$  anos, respectivamente. Esta média de idade foi próxima àquela observada em outros estudos que pesquisaram a associação entre estrogiloidíase e alcoolismo (OLIVEIRA et al., 2002; ZAGO-GOMES et al., 2002; MARQUES et al., 2010; SILVA et al., 2016). Neste estudo, os resultados mostraram que a frequência da infecção por *S. stercoralis* diagnosticada pelos exames parasitológicos foi maior entre alcoolistas do que entre não alcoolistas, o que está de acordo com estudos prévios realizados (OLIVEIRA et al., 2002; ZAGO-GOMES et



al., 2002; MARQUES et al., 2010; SCHÄR et al., 2013; SILVA et al., 2016). Os exames parasitológicos mostraram frequência de infecção por outros parasitos semelhantes entre os dois grupos, também concordando com dados da literatura (ZAGO-GOMES et al., 2002; MARQUES et al., 2010).

O aumento da frequência da infecção por *S. stercoralis* em alcoolistas pode ser atribuída a vários motivos. Alcoolistas podem frequentar ambientes com inadequadas condições sanitárias, o que aumenta a possibilidade de heteroinfecção (MARQUES et al., 2010; BEKNAZAROVA; WHILEY; ROSS, 2016), além disso, higiene pessoal deficiente aumenta as chances do processo de autoinfecção exógena, no qual larvas rabditoides presentes na região perianal de indivíduos infectados se diferenciam em larvas filarioides infectantes (MARQUES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2002). O aumento do risco de autoinfecção endógena também pode ser atribuído à diminuição da motilidade intestinal causada pelos efeitos do álcool nas proteínas musculares intestinais (WEGENER et al., 1991) possibilitando a transformação de larvas rabditoides em larvas filarioides infectantes devido ao maior tempo de permanência das larvas na luz intestinal (TEIXEIRA et al., 2016).

Mas talvez, o motivo mais importante para essa maior prevalência da estrogiloidíase entre alcoolistas seja o fato que o alcoolismo crônico é capaz de afetar todos os componentes do sistema imune inato e adaptativo (BARR et al., 2016). O etanol modula a função dos monócitos e células dendríticas na resposta imune inata, inibindo a fagocitose e a produção de fatores de crescimento (BROWN et al., 2006; SIGGINS et al., 2009; SZABO; MANDREKAR, 2009; BARR et al., 2016), como também, leva à diminuição e alterações das funções de células B e T periféricas aumentando o risco de infecções (PASALA; BARR; MESSAOUDI, 2015).

As alterações induzidas pelo uso crônico de álcool podem resultar em diminuição na defesa imune para eliminação do parasito e, conseqüentemente, pode ocorrer aumento da liberação de larvas nas fezes, resultando em maior facilidade de sua identificação nos exames parasitológicos (OLIVEIRA et al., 2002; ZAGO-GOMES et al., 2002; SILVA et al., 2016). O uso abusivo de etanol pode levar a alterações do metabolismo dos corticoides, aumentando a quantidade de metabólitos que podem mimetizar os hormônios ecdisteroides do parasito, desta forma, aumentam a fecundidade da fêmea de *S. stercoralis* e a sobrevivência das larvas, refletindo em um aumento da carga parasitária (SILVA et al., 2016) e, conseqüentemente, também em maior positividade no exame parasitológico (GENTA, 1992; ZAGO-GOMES et al., 2002).

Entre os métodos parasitológicos utilizados neste estudo observou-se que a frequência de resultados positivos para *S. stercoralis* foi maior pelo método de cultura em placa de ágar do que pelo método de Hoffman, Pons e Janer. Estudos prévios demonstraram que a cultura em placa de ágar apresenta maior sensibilidade e eficácia quando comparada a outros métodos parasitológicos, como, os métodos de Baerman-Moraes (INÊS et al., 2011; CAMPO-POLANCO; GUTIÉRREZ; ARIAS, 2014) e de Hoffman, Pons e Janer (ARAKAKI et al., 1990; KOGA et al., 1991; DE KAMINSKY et al., 1993; INÊS et al., 2011), inclusive entre indivíduos imunocomprometidos (LUVIRA et al., 2016).

Mesmo com a utilização de métodos parasitológicos de alta sensibilidade, a liberação irregular de larvas de *S. stercoralis* nas fezes pode levar a resultados falsos negativos. Portanto, a ausência de visualização de larvas nas fezes não significa necessariamente ausência da infecção (SATO et al., 1995; INÊS et al., 2011). Desta forma, a abordagem diagnóstica utilizando métodos imunológicos faz-se necessária para o diagnóstico da estrogiloidíase (SIDDIQUI; BERK, 2001; LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014), particularmente em indivíduos imunocomprometidos e com risco de hiperinfecção e/ou disseminação (VADLAMUDI; CHI; KRISHNASWAMY, 2006; TEIXEIRA et al., 2010; CORTI, 2016).

A ocorrência do ciclo de autoinfecção pelo *S. stercoralis* pode permitir que a infecção permaneça latente no hospedeiro por décadas, mesmo na ausência de novas infecções (KEISER; NUTMAN, 2004; SUDRÉ et al., 2006). Indivíduos cronicamente infectados, podem manter por décadas a carga parasitária com níveis não detectáveis nos exames parasitológicos ou podem manter a infecção ativa por autoinfecção ou reinfecção. (LIU; WELLER, 1993; FARDET et al., 2007). A infecção crônica ocasiona uma exposição constante dos antígenos do parasito aos componentes celulares e humorais do sistema imune do hospedeiro (GONÇALVES et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009) mantendo a produção de anticorpos (SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2016).

Desta forma, os métodos imunológicos detectam diferentes classes de imunoglobulinas específicas anti-*Strongyloides* e podem ser utilizados como métodos alternativos no diagnóstico da estrogiloidíase por apresentarem elevadas sensibilidade e especificidade, que são maiores do que aquelas dos métodos parasitológicos (van DOOR et al., 2007; BOSQUI et al., 2015; COSTA-CRUZ, 2016; SILVA et al., 2016). Exames com maiores sensibilidades são importantes, pois a estrogiloidíase na sua forma crônica pode manter-se de maneira assintomática ou oligossintomática e em indivíduos imunossuprimidos pode evoluir com hiperinfecção ou disseminação (MARUYAMA et al., 2006).

A obtenção e a identificação de antígenos de altas especificidades e sensibilidades por meio do fracionamento de extratos totais de *S. venezuelensis* subsidiam os estudos de diagnóstico sorológico da estrogiloidíase (MACHADO et al., 2003; FELICIANO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2012a; INÊS et al., 2013) e podem melhorar a sensibilidade e especificidade dos métodos sorológicos o diagnóstico da estrogiloidíase (INÊS et al., 2013). A fração detergente obtida do extrato salino total de *S. venezuelensis* é considerada eficiente no diagnóstico da estrogiloidíase humana (FELICIANO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2010).

Inicialmente, neste estudo hipotetizou-se que indivíduos alcoolistas crônicos, devido as possíveis alterações no sistema imune causada pelo álcool, poderiam ter menor produção de anticorpos específicos contra o parasito *S. stercoralis* e assim, possivelmente, os métodos imunológicos para o diagnóstico desta infecção poderiam apresentar menores sensibilidades. No entanto, observou-se neste estudo que tanto a frequência de positividade quanto o valor da mediana do índice ELISA para anticorpos IgG anti-*Strongyloides* foi maior entre indivíduos alcoolistas do que entre indivíduos não alcoolistas, o que mostrou que independentemente de possíveis imunossupressões, alcoolistas apresentaram produção de anticorpos específicos contra o parasito *S. stercoralis*.

Anticorpos da classe IgG correspondem a cerca de 75% do total de anticorpos séricos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Entre as subclasses de IgG, formam-se, principalmente, IgG1 e IgG4 no desenvolvimento da resposta contra *S. stercoralis* (ATKINS et al., 1999; RODRIGUES et al., 2007). Assim, a presença do parasito *S. stercoralis* no hospedeiro resulta em uma resposta imune mediada por anticorpos específicos da classe IgG, seguindo-se da detecção de anticorpos da classe IgA, IgM e IgE (GROVE, 1996). Na estrogiloidíase os títulos de IgG podem ser detectados duas semanas pós-infecção, com um pico em torno da sexta semana, que dura por até 20 semanas, e posteriormente há uma queda (GROVE, 1996; IRIEMENAM et al., 2010; LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014). Esse declínio dos níveis de anticorpos IgG anti-*S. stercoralis* também foi observado após o tratamento para estrogiloidíase, geralmente em um período inferior a um ano (LINDO et al., 1996).

Níveis detectáveis de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* também foram observados entre indivíduos imunocomprometidos em outros estudos, tais como, pacientes com neoplasias hematológicas (SCHAFFEL et al., 2001), pacientes diabéticos tipo 2 (MENDONÇA et al., 2006) e crianças imunodeprimidas (PAULA et al., 2000). Nestes

estudos, pode-se observar que apesar da imunodeficiência, a presença da infecção pelo *S. stercoralis* levou a produção de anticorpos específicos contra o parasito.

No presente estudo foi observada a presença de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* tanto em indivíduos alcoolistas quanto em indivíduos não alcoolistas que tiveram exames parasitológicos negativos para *S. stercoralis*, o que poderia ser decorrente da maior sensibilidade dos métodos imunológicos em relação aos parasitológicos. O aumento da sensibilidade dos exames parasitológicos de fezes está associado ao número de amostras de fezes coletadas e analisadas, com sensibilidade dos exames de fezes variando de 15 a 24%, com uma amostra, aumentando para 55 e 78% quando utilizada três amostras e podendo alcançar 100% sensibilidade se sete amostras fecais frescas são examinadas (UPARANUKRAW; PHONGSRI; MORAKOTE, 1999; SIDDIQUI; BERK, 2001; HIRATA et al., 2007). No entanto, a dificuldade do exame com várias amostras fecais reside no tempo necessário para coleta e inconveniência para o paciente (HIRA et al., 2004).

A presença de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* em indivíduos com exames parasitológicos de fezes negativos para *S. stercoralis* também pode estar associada a infecção ativa aguda ou crônica por *S. stercoralis* com baixa ou irregular eliminação de larvas nas fezes (SCHAFFEL et al., 2001; SILVA et al., 2014; BUONFRATE et al., 2015; SILVA et al., 2016) ou com infecção passada que foi naturalmente eliminada e manteve anticorpos de memória (YORI et al., 2006; AHMAD et al., 2013).

Por outro lado, a presença de resultado imunológico falso positivo também deve ser considerada. Reações cruzadas com outros parasitos é considerada uma importante limitação dos métodos imunológicos para o diagnóstico da estrogiloidíase (SCHAFFEL et al., 2001; INÊS et al., 2013; SILVA et al., 2014; LUVIRA et al., 2016) devido à complexidade antigênica dos helmintos (ROSSI et al., 1993; SUDRÉ et al., 2006). Em testes como ELISA, a reatividade cruzada nos testes sorológicos para estrogiloidíase podem ocorrer, principalmente, com *Schistosoma* sp. e ancilostomatídeos (LINDO et al. 1994; GROVE, 1996; BISOFFI et al., 2014). No entanto, neste estudo, poucos helmintos foram encontrados nos métodos parasitológicos utilizados entre os indivíduos avaliados.

Um indivíduo alcoolista e outro não alcoolista com exames parasitológicos positivos para *S. stercoralis* foram negativos para IgG anti-*Strongyloides*. Em ambos os indivíduos, não se pode descartar a hipótese de resultado falso negativo, considerando-se que a sensibilidade do antígeno usado no método ELISA não alcança 100%. Neste estudo, para detecção de anticorpos específicos anti-*Strongyloides* utilizou-se como antígeno a fração detergente, e este

antígeno apresenta valores de especificidade (97,5%) e sensibilidade (95%) superiores quando comparado a outros extratos antigênicos (FELICIANO et al., 2010).

Como referido anteriormente, anticorpos IgG podem ser detectados duas semanas após a infecção (GROVE, 1996; IRIEMENAM et al., 2010; LEVENHAGEN; COSTA-CRUZ, 2014), portanto resultado falso negativo pode ser associado à uma infecção na fase aguda, sem ainda a produção de anticorpos IgG específicos em níveis detectáveis (SCHAFFEL et al., 2001; BUONFRATE et al., 2015; SILVA et al., 2016). No entanto, a presença de anticorpos não diferenciam totalmente entre infecção ativa de infecções anteriores já tratadas e curadas, ou mesmo, de resultados sorológicos falsos positivos (LINDO et al., 1994; HIRA et al., 2004). Além disso, em alcoolistas, as alterações na resposta imune induzida por metabólitos de corticoides podem modificar a produção de anticorpos (MARQUES et al., 2010; SILVA et al., 2016) o que justificaria a ausência de anticorpos específicos em indivíduos alcoolistas com exames parasitológicos de fezes positivos.

Enquanto a detecção de anticorpos IgG sinaliza a cronicidade da doença e/ou doença tratada com a presença de anticorpos de memória (LIU; WELLER, 1993; GROVE, 1996; GONÇALVES et al., 2012b), a detecção de imunocomplexos no soro demonstra que a infecção está em atividade. Imunocomplexos são formados a partir da ligação de antígenos parasitários a anticorpos específicos produzidos pelo hospedeiro e são importantes para ativação do sistema complemento (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001; FRANK; HESTER, 2009; GONÇALVES et al., 2012b; DE CARVALHO et al., 2013). Após o estímulo antigênico, os anticorpos produzidos se combinam com os determinantes antigênicos, formando então, imunocomplexos circulantes. Este processo é um importante mecanismo de defesa do organismo, pois possibilita a neutralização, eliminação e inativação de antígenos impedindo que sejam depositados e que causem danos aos tecidos do hospedeiro (MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 1997). A presença de imunocomplexos circulantes tem sido relatada em doenças parasitárias (OHYAMA et al., 2016), entre elas, a *strongiloidíase* (GONÇALVES et al., 2016; BOSQUI et al., 2017a).

Em relação ao índice ELISA para imunocomplexos observou-se no presente estudo que tanto a frequência de resultados positivos quanto o valor da mediana foram maiores entre indivíduos alcoolistas do que entre indivíduos não alcoolistas, o que pode ser devido à maior frequência de infecção pelo parasito *S. stercoralis* entre os alcoolistas e também pela boa capacidade dos alcoolistas em produzir anticorpos IgG anti-*Strongyloides*.

No entanto, entre os 12 indivíduos alcoolistas positivos para *S. stercoralis* nos métodos parasitológicos, cinco (41,7%) foram negativos para imunocomplexos. Os imunocomplexos

promovem a ativação das vias clássica e alternativa do sistema complemento, que por sua vez participam dos principais mecanismos efetores da resposta imune humoral. Este sistema é constituído por proteínas séricas e de membrana que participam de diferentes funções efetoras, envolvidas com a eliminação dos antígenos, entre elas, o processamento de imunocomplexos. Este processamento apresenta duas propriedades importantes, como a inibição da precipitação imune e a solubilização de imunocomplexos pré-formados, além de contribuir para os mecanismos de transporte e eliminação dos complexos antígeno-anticorpo (MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 1997).

A via clássica é essencial para a inibição da precipitação imune (NAAMA et al., 1984), ou seja, desempenha papel importante em prevenir a formação de imunocomplexos grandes, os quais podem se depositar nos tecidos (MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 1997). A inibição da precipitação imune só é observada com complexos formados por IgG ou IgM (JOHNSON et al., 1987). A via alternativa é importante na solubilização dos complexos já formados. A ineficiência destes mecanismos pode levar à deposição dos complexos antígeno-anticorpo nos tecidos (MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 1997).

A ausência de detecção de imunocomplexos entre indivíduos que apresentaram exames parasitológicos positivos também pode ser justificada pelas propriedades imunoquímicas dos complexos antígeno-anticorpo. O tamanho do imunocomplexo e a natureza do antígeno e do anticorpo influenciam a habilidade dos imunocomplexos ativarem o complemento. Imunocomplexos muito pequenos ou muito grandes são facilmente eliminados, enquanto que aqueles de tamanho intermediário podem, dependendo do antígeno e/ou anticorpo, ser mais susceptíveis à deposição nos tecidos (MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 1997). Assim, em qualquer destas situações os IC não serão detectáveis no soro. Além disso, os níveis de complexos imunes circulantes podem ser influenciados por fatores tais como, classe e quantidade de anticorpos; tamanho, quantidade e propriedades físico-químicas dos antígenos; interações inespecíficas entre antígeno e anticorpo e velocidade de formação, que é determinada pela disponibilidade de antígeno e velocidade de síntese de anticorpo (McDOUGAL; McDUFFIE, 1985; ROTHER; TILL; HANSCH, 1998).

A habilidade dos imunocomplexos ativarem o sistema complemento também é influenciada pelas diferenças entre as classes e subclasses de imunoglobulinas, como exemplo, pode-se citar as subclasses de IgG humana, que diferem quanto à habilidade para ativar o complemento devido às características estruturais que determinam as diferenças isotipo-específicas (TAO; SMITH; MORRISON, 1993). Outras propriedades como a afinidade do anticorpo e as proporções antígeno-anticorpo também afetam a ativação do

complemento (LUCISANO-VALIM; LACHMANN, 1991; MARZOCCHI; LUCISANO-VALIM, 1996).

Em um estudo com ratos experimentalmente infectados por *S. venezuelensis* demonstrou-se que a detecção de imunocomplexos em amostras de soro de animais não imunossuprimidos foi possível do 5<sup>o</sup> ao 13<sup>o</sup> dia pós-infecção e em animais imunossuprimidos, a detecção foi possível até o 21<sup>o</sup> pós-infecção, ou seja, ratos imunocompetentes foram capazes de acelerar a eliminação de imunocomplexos (GONÇALVES et al., 2016). Assim, a detecção de imunocomplexos, que possibilita o diagnóstico da infecção em atividade, pode ser particularmente útil em condições de imunossupressão, uma vez que são detectáveis por mais tempo (GONÇALVES et al., 2016). Este fato sinaliza a importância da associação desse método diagnóstico para auxiliar a detecção da infecção por *S. stercoralis* em imunodeprimidos (GONÇALVES et al., 2012b).

Na estrogiloidíase, devido ao fato do ciclo do parasito envolver as mucosas pulmonares e intestinal, o hospedeiro pode elaborar resposta local e sistêmica mediada por IgA (ATKINS et al., 1999; COSTA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2010). A IgA é o segundo anticorpo mais presente no soro e representa a classe mais frequentes nas mucosas e secreções (van EGMOND et al., 2001; YOO; MORRISON, 2005; MOTA-FERREIRA et al., 2009; PASALA; BARR; MESSAOUDI, 2015). É descrito que uma associação negativa entre a resposta imune mediada por IgA e a eliminação de larvas suporta a hipótese de um papel efetor para a IgA na estrogiloidíase humana, uma vez que esta imunoglobulina modula a eliminação de larvas, pois inibe a fecundidade do parasito e a viabilidade dos ovos na estrogiloidíase humana (ATKINS et al., 1999).

Em alguns estudos foi observado que os níveis de anticorpos IgA no soro aumentam com o consumo de álcool (MILLI et al., 1992; McMILLAN et al., 1997; GONZALES-QUINTELA et al., 2008). No entanto, no presente estudo observou-se menor frequência de positividade e de valores de mediana do índice ELISA para anticorpos IgA anti-*Strongyloides* no soro de indivíduos alcoolistas quando comparado aos não alcoolistas. Além disso, observou-se que entre indivíduos alcoolistas com exames parasitológicos positivos para *S. stercoralis*, apenas um quarto deles tinham anticorpos IgA anti-*Strongyloides* detectáveis no soro. Desta forma, a menor frequência de positividade de anticorpos IgA anti-*Strongyloides* observada entre indivíduos alcoolistas, quando comparados aos indivíduos não alcoolistas pode estar relacionada a maior frequência da infecção e/ou de detecção da infecção por *S. stercoralis* neste grupo de indivíduos por meio dos métodos parasitológicos.

Neste estudo foi observada uma associação moderada entre os métodos imunológicos utilizados, ou seja, a imunidade protetora contra larvas infectantes do *S. stercoralis* envolve anticorpos específicos (IRIEMENAM et al., 2010) e a correlação positiva entre a produção de anticorpos específicos para *Strongyloides* em indivíduos alcoolistas pode tornar válida a aplicação destes imunoenaios entre alcoolistas.

Os ensaios de avidéz têm sido desenvolvidos como uma ferramenta complementar ao ELISA clássico para determinar a afinidade funcional da IgG específica para diversas doenças parasitárias, entre elas a estrogiloidíase (GONZAGA et al., 2011; BOSQUI et al., 2017b). A afinidade funcional define o conjunto de forças de ligação entre um anticorpo e um antígeno. É dependente da multivalência do antígeno e da afinidade antígeno-anticorpo. Esta afinidade dos sítios no anticorpo para a ligação ao antígeno aumenta com tempo de desafio antigênico (GUTIERREZ; MAROTO, 1996; KAHN et al., 2009).

A determinação da avidéz de anticorpos IgG apresentou maior índice entre indivíduos alcoolistas do que entre indivíduos não alcoolistas, assim como a detecção de anticorpos IgG específicos e imunocomplexos circulantes. Observou-se também a associação entre exames parasitológicos positivos para *S. stercoralis* e dados de avidéz (IA>75%). Testes sorológicos de avidéz são conhecidos por discriminarem entre infecções agudas e crônicas, uma vez que, durante as infecções primárias, o estímulo antigênico induz, inicialmente, a produção de anticorpos de baixa avidéz. Nos casos crônicos ou de reinfecção, ocorre produção de anticorpos específicos de alta avidéz (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2003).

Entre indivíduos alcoolistas foi observado maiores índices de avidéz de anticorpos IgG em relação aos não alcoolistas, ou seja, indivíduos alcoolistas respondem com anticorpos de alta avidéz. Este maior índice de avidéz entre alcoolistas pode estar associado a uma exposição constante aos antígenos do parasito ou a casos de reinfecção. Observou-se também que entre os alcoolistas com eliminação de larvas nas fezes, 91% deles apresentaram índices de avidéz maiores que 75%. O resultado concorda com Gonzaga et al. (2011) que concluíram que a avidéz de IgG tem a habilidade de detectar a infecção ativa por *S. stercoralis* com eliminação de larvas nas fezes. A maior detecção de IgG gênero-específica combinada com a maior avidéz, mostrou que os alcoolistas produzem uma resposta humoral definida, ou seja, a avidéz de anticorpos IgG é um marcador válido para a infecção, sendo que a baixa avidéz de IgG nem sempre identifica uma infecção recentemente adquirida, mas a alta avidéz pode excluir infecções primárias (JENUN; STRAY-PEDERSEN; GUNDERSEN, 1997; BÉLA et al., 2008; GONZAGA et al., 2011).



A maturação da resposta de IgG após uma infecção primária, determinada pela capacidade de ligação, pode variar consideravelmente entre os indivíduos (BÉLA et al., 2008; MANHANI et al., 2009). A explicação pode estar nas diferenças entre a gravidade da infecção, grau de excreção larval, interação entre parasito e hospedeiro (UPARANUKRAW; PHONGSRI; MORAKOTE, 1999) e maturação de avides de diferentes subclasses de IgG (VIANA; RABELLO; KATZ, 2001).

Considerando que indivíduos alcoolistas são mais susceptíveis às formas graves da estrogiloidíase, o aprimoramento dos métodos diagnósticos é necessário para melhorar a sensibilidade nos estudos epidemiológicos, as medidas de controle desta infecção e a sua prevenção, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Com base neste conceito, a detecção de anticorpos IgG anti-*Srongyloides*, de imunocomplexos circulantes e a determinação do índice de avides em amostras de soro se mostraram uma alternativa potencial para o diagnóstico da estrogiloidíase em indivíduos alcoolistas.

## 6 CONCLUSÕES

- Quando avaliados pelos métodos parasitológicos, os indivíduos alcoolistas apresentaram maior frequência da infecção por *S. stercoralis* do que indivíduos não alcoolistas;
- As frequências de positividade de detecção de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* e de imunocomplexos, assim como os valores de medianas dos resultados de IgG anti-*Strongyloides*, foram maiores entre indivíduos alcoolistas;
- Apesar do consumo crônico do álcool potencialmente causar imunossupressão, os alcoolistas avaliados neste estudo tiveram boas respostas imunológicas à infecção pelo *S. stercoralis*;
- A frequência de positividade de anticorpos IgA anti-*Strongyloides* no soro foi menor entre indivíduos alcoolistas quando comparado aos não alcoolistas;
- A correlação positiva entre os níveis séricos de IgG anti-*Strongyloides* e imunocomplexos, entre os níveis de IgG anti-*Strongyloides* e IgA anti-*Strongyloides* e entre os níveis de imunocomplexos e IgA anti-*Strongyloides* torna válida a aplicação destes imunoenaios entre alcoolistas;
- O índice de avididade de anticorpos IgG anti-*Strongyloides* é potencialmente aplicável como ferramenta complementar ao ELISA.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**, 8ed, Philadelphia: Saunders, 2015. 535p.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**, 8ed, Philadelphia: Saunders, 2003. 402p.
- ADDOLORATO, G.; CAPRISTO, E.; GASBARRINI, G.; STEFANINI, G. F. Depression, alcohol abuse and oro-caecal transit time. **Gut**, v.41, n.3, p.417–418, 1997. <https://doi.org/10.1136/gut.41.3.417a>
- ADINOFF, B.; IRANMANESH, A.; VELDHUIS, J.; FISHER, L. Disturbances of the stress response: the role of the HPA axis during alcohol withdrawal and abstinence. **Alcohol Health and Research World**, v.22, n.1, p.67-72, 1998.
- AHMAD, A. F.; HADIP, F.; NGUI, R.; LIM, Y. A. L.; MAHMUD, R. Serological and molecular detection of *Strongyloides stercoralis* infection among an Orang Asli community in Malaysia. **Parasitology Research**, v.112, n.8, p.2811-2816, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3450-z>
- ANURADHA, R.; MUNISANKAR, S.; BHOOTRA, Y.; JAGANNATHAN, J.; DOLLA, C.; KUMARAN, C.; NUTMAN, T. B.; BABU, S. IL-10 and TGF  $\beta$  – mediated Th9 responses in a human helminth infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.10, n.1, p. e4317, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004317>
- ARAKAKI, T.; HASEGAWA H.; ASATO, R.; IKESHIRO, T.; KINJO, F.; SAITO, A.; IWANAGA, M. A new method to detect *Strongyloides stercoralis* from human stool. **Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 16, n.1, p.11-17, 1988. <https://doi.org/10.2149/tmh1973.16.11>
- ARAKAKI, T.; IWANAGA, M.; KINJO, F.; SAITO, A.; ASATO, R.; IKESHIRO, T. Efficacy of agar-plate culture in detection of *Strongyloides stercoralis* infection. **The Journal of Parasitology**, v.76, n.3, p.425–428, 1990. <https://doi.org/10.2307/3282680>
- ARIZONO, N.; NAKANIHSI, K.; HORII, T.; TANABE, K. Progress in the molecular biology of malaria and the immunology of nematode infections. **Trends in Parasitology**, v. 23, n.4, p.175-181, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.02.005>
- ATKINS, N. S.; LINDO, F. J.; LEE, M. G.; CONWAY, D. J. BAILEY, J. W.; ROBINSON, R. D., BUNDY, D. A. P. Humoral responses in human strongyloidiasis: correlations with infection chronicity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, p. 609-613, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(97\)90049-3](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(97)90049-3)
- ATKINS, N. S.; CONWAY, D. J.; LINDO, J. F.; BAILEY, J. W.; BUNDY, D. A. P. L3 antigen-specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlation with larval output. **Parasite Immunology**, v.21, n.10, p.517-526, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1999.00248.x>

BABOR, T; HIGGINS-BIDDLE, J. C.; SAUNDERS, J. B.; MONTEIRO, M. G. **AUDIT – the alcohol use disorders identification test guidelines for use in primary care**. Geneva: World Health Organization, 2001. p.4-36.

BACHMANN, M. F.; OXENIUS, A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. **European Molecular Biology Organization Reports**, v.8, n.12, p.1142–1148, 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401099>

BADRICK, E.; BOBAK, M.; BRITTON, A.; KIRSCHBAUM, C.; MARMOT, M.; KUMARI, M. The relationship between alcohol consumption and cortisol secretion in an aging cohort. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 3, p. 750–757, 2008. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-0737>

BAERMANN, G. Eine Einfache Methode zur Auffinding von *Ankylostomum* (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel. Mit H. Geneesk. **Laboratories Weltevreden Feestbundel**, p. 41-47, 1917.

BAGASRA, O.; HOWEEDY, A.; DORIO, R.; KAJDACSY-BALLA, A. Functional analysis of T-cell subsets in chronic experimental alcoholism. **Immunology**, v.61, n.1, p.63–69, 1987.

BARR, T.; HELMS, C.; GRANT, K.; MESSAOUDI, I. Opposing effects of alcohol on the immune system. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.65, p.242-251, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.09.001>

BARROS, N.; MONTES, M. Infection and hyperinfection with *Strongyloides stercoralis*: clinical presentation, etiology of disease, and treatment options. **Current Tropical Medicine Reports**, v.1, p.223-228, 2014. <https://doi.org/10.1007/s40475-014-0030-y>

BASILE, A.; SIMZAR, S.; BENTOW, J.; ANTELO, F.; SHITABATA, P.; PENG, S. K.; CRAFT, N. Disseminated *Strongyloides stercoralis*: hyperinfection during medical immunosuppression. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.63, n.5, p.896-902, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.09.037>

BAVAY, A. Sur languilule intestinale (*Anguillula intestinalis*) nouveau ver nýmatoide trove par le Dr. Normand chez les nalades atteints de diarrhea de Cochinchine. **Compose Rend Science Biologique**, v. 84, p. 258-266, 1876.

BEKNAZAROVA, M.; WHILEY, H.; ROSS, K. Strongyloidiasis: a disease of socioeconomic disadvantage. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.13, n.5, p.517-532, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijerph13050517>

BÉLA, S. R.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; PIROVANI, C. P.; CHAVES-BORGES, F. A.; OLIVEIRA, T. C.; MINEO, J. R. Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.62, n.3, p.245-254, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.05.017>

- BENCKERT, J.; SCHMOLKA, N.; KRESCHER, C.; ZOLLER, M. J.; STURM, A.; WIEDENMANN, B.; WARDEMANN, H. The majority of intestinal IgA+ and IgG+ plasmablasts in the human gut are antigen-specific. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n.5, p.1946-1955, 2011. <https://doi.org/10.1172/JCI44447>
- BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; MONTRESOR, A.; REQUENA-MÉNDEZ, A.; MUÑOZ, J.; KROLEWIECKI, A. J.; GOTUZZO, E.; MENA, M. A.; CHIODINI, P. L.; ANSELMINI, M.; MOREIRA, J.; ALBONICO, M. *Strongyloides stercoralis*: a plea for action. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.5, p. e2214, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002214>
- BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; SEQUI, M.; MEJIA, R.; CIMINO, R. O.; KROLEWIECKI, A. J.; ALBONICO, M.; GOBBO, M.; BONAFINI, S.; ANGHEBEN, A.; REQUENA-MENDEZ, A.; MUÑOZ, J.; NUTMAN, T. B. Diagnostic accuracy of five serologic tests for *Strongyloides stercoralis* Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.9, n.2, p.e0003491, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002640>
- BLANKENHAUS, B.; KLEMM, U.; ESCHBACH, M. L.; SPARWASSER, T.; HUEHN, J.; KÜHL, A. A.; LODDENKEMPER, C.; JACOBS, T.; BRELOER, M. *Strongyloides ratti* infection induces expansion of Foxp3+ regulatory T cells that interfere with immune response and parasite clearance in BALB/c mice. **Journal of Immunology**, v.186, n.7, p.4295-4305, 2011. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001920>
- BLANKENHAUS, B.; REITZ, M.; BRENZ, Y.; ESCHBACH, M. L.; HARTMANN, W.; HABEN, I.; SPARWASSER, T.; HUEHN, J.; KÜHL, A. A.; FEYERABEND, T. B.; RODEWALD, H. R.; BRELOER, M. 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 Pathogens**, v.10, n.2, e1003913, 2014.
- BLAXTER, M. L.; de LEY, P.; GAREY, J. R.; LIU, L. X.; SCHELDEMAN, P.; VIERSTRAETE, A.; VANFLETEREN, J. R.; MACKAY, L. Y.; DORRIS, M.; FRISSE, L. M.; VIDA, J. T.; THOMAS, W. K. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**, v. 392, p. 71-75, 1998. <https://doi.org/10.1038/32160>
- BON, B.; HOUZE, S.; TALABANI, H.; MAGNE, D.; BELKADI, G.; DEVELOUX, M.; SENGHOR, Y.; CHANDENIER, J.; ANCELLE, T.; HENNEQUIN, C. Evaluation of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of strongyloidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.5, p.1716-1719, 2010. <https://doi.org/10.1128/JCM.02364-09>
- BOSCOLO, M.; GOBBO, M.; MANTOVANI, W.; DEGANI, M.; ANSELMINI, M.; MONTEIRO, G. B.; MAROCCO, S.; ANGHEBEN, A.; MISTRETTA, M.; SANTACATTERINA, M.; TAIS, S.; BISOFFI, Z. Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for strongyloidiasis as a tool for diagnosis and follow-up. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, n.2, p.129-133, 2007. <https://doi.org/10.1128/CVI.00278-06>

BOSQUI, L. R.; GONÇALVES, A.L.; GONÇALVES-PIRES M. do R.; CUSTODIO, L. A.; de MENEZES, M. C.; MURAD, V. A.; de PAULA, F. M.; PAVANELLI, W. R.; CONCHON-COSTA, I.; COSTA-CRUZ, J. M.; COSTA, I. N. Detection of parasite-specific IgG and IgA in paired serum and saliva samples for diagnosis of human strongyloidiasis in northern Paraná state, Brazil. **Acta Tropica**, v. 150, p.190-195, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.026>

BOSQUI, L. R.; GONÇALVES, A. L. R.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; PAVANELLI, W. R.; CONCHON-COSTA, I.; COSTA-CRUZ, J. M. Immune complex detection in saliva samples: an innovative proposal for the diagnosis of human strongyloidiasis. **Parasitology**, v.2017, p.1-5, 2017a. <https://doi.org/10.1017/S0031182017002232>

BOSQUI, L. R.; GONZAGA, H. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; PAULA, F. M.; ALMEIDA, R. S.; PAVANELLI, W. R.; CONCHON-COSTA, I.; COSTA-CRUZ, J. M.; COSTA, I. N. Avidity as a criterion for diagnosis of human strongyloidiasis increases specificity of IgG ELISA. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.89, n.4, p.262-264, 2017b. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.08.008>

BOULWARE, D. R.; STAUFFER, W. M.; HENDEL-PATERSON, B. R.; ROCHA, J. L.; SEET, R. C.; SUMMER, A. P.; NIELD, L. S.; SUPPARATPINYO, K.; CHAIWARITH, R.; WALKER, P. F. Maltreatment of *Strongyloides* infection: case series and worldwide physicians-in-training survey. **American Journal of Medicine**, v. 120, n.6, p. 545-548, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.05.072>

BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde Mental em Dados** – 12, ano 10, n 12. Informativo eletrônico. Brasília, DF, 2015, 48p. Disponível em:

<<http://www.saude.gov.br/bvs/saudemental>> Acesso em: 01 de agosto 2017.

BROWN, L. A. S.; COOK, R. T.; JERRELS, T. R.; KOLLS, J. K.; NAGY, L. E.; SZABO, G.; WANDS, J. R.; KOVACS, E. J. Acute and chronic alcohol abuse modulate immunity. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v.30, n.9, p.1624-1631, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00195.x>

BUONFRATE, D.; FORMENTI, F.; PERANDIN, F.; BISOFFI, Z. Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v.21, n.6, p.453-552, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.04.001>

CAMPO-POLANCO, L.; GUTIÉRREZ, L. A.; ARIAS, J. C. Infección por *Strongyloides stercoralis*: metanálisis sobre evaluación de métodos diagnósticos convencionales (1980-2013). **Revista Española de Salud Pública**, v.88, n.5, p.581-600, 2014. <https://doi.org/10.4321/S1135-57272014000500004>

CARVALHO, E. M.; PORTO, A. da F. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. **Parasite Immunology**, v.26, n.11-12, p.487-497, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.0141-9838.2004.00726.x>

CHAVES, L. A.; GONÇALVES, A. L. R.; PAULA, F. M.; SILVA, N. M.; SILVA, C. V.; COSTA-CRUZ, J. M.; FREITAS, M. A. R. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for evaluation of fecal samples of immunosuppressed rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology**, v.142, n.14, p. 1715-1721, 2015. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001298>

CHIEFFI, P. P.; CHIATTONE, C. S.; FELTRIM, E. N.; ALVES, R. C.; PASCHOALOTTI, M. A. Coinfection by *Strongyloides stercoralis* in blood donors infected with human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 in São Paulo city, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 711–712, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000500017>

CHOUDHRY, M.A.; LI, X.; CHAUDRY, I.H. 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**, v.1, n.4, p.428-434, 2006. <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9031-5>

CIMERMAN, S.; CASTAÑEDA, C. G.; JULIANO, W. A.; PALACIOS, R. Perfil das enteroparasitoses diagnosticadas em pacientes com infecção pelo vírus HIV na era da terapia antiretroviral potente em um centro de referência em São Paulo: Brasil. **Parasitología Latinoamericana**, v.57, n.3/4, p.111–118, 2002.

CIMERMAN, S.; TEIXEIRA, M. C.; GIRIO, D.; VIEIRA, T. de O.; CALORE, E. E.; BARRA, L. A. C. Hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis* em paciente com Aids. **Revista Panamericana de Infectología**, v.8, n.2, p.32–34, 2006.

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? **Clinical Infectious Disease**, v.22, n.4, p.737, 1996. <https://doi.org/10.1093/clinids/22.4.737>

COOK, R. T. Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system – a review. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v. 22, n.9, p. 1927-1942, 1998. <https://doi.org/10.1097/00000374-199812000-00007>

CORTHÉSY, B. Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis? **Journal of Immunology**, v.178, n.1, p.27-32, 2007. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.1.27>

CORTI, M. *Strongyloides stercoralis* in immunosuppressed patients. **Archives of Clinical Infectious Disease**, v.11, n.1, e27510, 2016. <https://doi.org/10.5812/archcid.27510>

CORTI, M.; VILLAFANE, M. F.; TRIONE, N.; RISSO, D.; ABUÍN, J. C.; PALMIERI, O. Infección por *Strongyloides stercoralis*: estudio epidemiológico, clínico, diagnóstico y terapéutico en 30 pacientes. **Revista Chilena de Infectología**, v. 28, n.3, p. 217-222, 2011. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182011000300003>

COSTA, I. N.; SOPELETE, M. C.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; COSTA-CRUZ, J. M. IgA and IgG antibodies in paired serum and saliva samples in human strongyloidiasis. **Acta Parasitológica**, v.48, n.4, p.306-311, 2003.

- COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides* spp. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**, 13. ed., São Paulo: Atheneu, 2016. p.313-323.
- COSTA-CRUZ, J. M.; BULLAMAH, C. B.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; CAMPOS, D. M. B.; VIEIRA, M. A. Cryo-microtome sections of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.39, n.6, p.313-317, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651997000600001>
- COSTA-CRUZ, J. M.; MACHADO, E. R.; CAMPOS, D. M. B. Seroepidemiological study of human strongyloidiasis with blood samples collected on filter paper, in Abadia dos Dourados Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.40, n.5, p.329-331, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651998000500013>
- DACAL, E.; SAUGAR, J., M.; SOLER, T.; AZCÁRATE, J. M; JIMÉNEZ, M. S.; MERINO, F. J.; RODRÍGUEZ, E. Parasitological versus molecular diagnosis of strongyloidiasis in serial stool samples: how many. **Journal of Helminthology**, v.92, n.1, p.12-16, 2018. <https://doi.org/10.1017/S0022149X17000050>
- DE CARVALHO, C.; PARTATA, A. K.; HIRAMOTO, R. M.; BORBOREMA, S. E. T.; MEIRELES, L. R.; NASCIMENTO, N. d.; de ANDRADE, H. F. Jr. A simple immune complex dissociation ELISA for leishmaniasis: standardization of the assay in experimental models and preliminary results in canine and human samples. **Acta Tropica**, v.125, p.128-136, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.10.010>
- DE KAMINSKY, R. G. Evaluation of three methods for laboratory diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **The Journal of Parasitology**, v.79, n.2, p.277-280, 1993. <https://doi.org/10.2307/3283519>
- DOMINGUEZ-SANTALLA, M.; VIDAL, C.; VIÑUELA, J.; PÉREZ, L. F.; GONZÁLEZ-QUINTELA, A. Increased serum IgE in alcoholics: relationship with Th1/Th2 cytokine production by stimulated blood mononuclear cells. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v.25, n.8, p.1198-1205, 2001. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2001.tb02336.x>
- DREYER, G.; FERNANDES-SILVA, E.; ALVES, S.; ROCHA, A.; ALBUQUERQUE, R.; ADDISS, D. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: implications for diagnosis and clinical trials. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.10, p.2569-2571, 1996.
- DULLEY, F. L.; COSTA, S.; COSENTINO, R.; GAMBA, C.; SABOYA, R. *Strongyloides stercoralis* hiperinfection after allogeneic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 43, n.9, p. 741-742, 2009. <https://doi.org/10.1038/bmt.2008.383>
- DUTCHER, J. P.; MARCUS, S. L.; TANOWITZ, H. B.; WITTNER, M.; FUKS, J. Z.; WIERNIK, P. H. Disseminated strongyloidiasis with central nervous system involvement diagnosed antemortem in a patient with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitts lymphoma. **Cancer**, v.66, n.11, p.2417-2420, 1990. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19901201\)66:11<2417::AID-CNCR2820661129>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19901201)66:11<2417::AID-CNCR2820661129>3.0.CO;2-G)



DZIEMIAN, E.; ZARNOWSKA, H.; KOŁODZIEJ-SOBOCIŃSKA, M.; MACHNICKA, B. Determination of the relative avidity of the specific IgG antibodies in human toxocariasis. **Parasite Immunology**, v.30, n.3, p.187-190, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.01010.x>

EWING, J. A. Detecting alcoholism: the CAGE questionnaire. **The Journal of the American Medical Association (JAMA)**, v.252, n.14, p. 1905-1907, 1984. <https://doi.org/10.1001/jama.252.14.1905>  
<https://doi.org/10.1001/jama.1984.03350140051025>

FARDET, L.; GÉNÉREAU, T.; POIROT, J.; GUIDET, B.; KETTANEH, A.; CABANE, J. Severe strongyloidiasis in corticosteroid-treated patients: case series and literature review. **Journal of Infection**, v. 54, n.1, p. 18-27, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.01.016>

FAUST, E. C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J. Comparative efficiency of various techniques for diagnosis of protozoa and helminthes in feces. **Journal of Parasitology**, v.25, p.241-262, 1939. <https://doi.org/10.2307/3272508>

FELICIANO N. D.; GONZAGA, H. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; GONÇALVES, A. L. R.; RODRIGUES, R. M.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.67, n.2, p.153-161, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.01.012>

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

FERREIRA, C. M.; PEREIRA, A. T. M.; DE SOUZA, R. S.; CASSALI, G. D.; SOUZA, D. G.; LEMOS, V. S.; TEIXEIRA, M. M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Prevention of changes in airway function facilitates *Strongyloides venezuelensis* infection in rats. **Microbes and Infection**, v.9, n.7, p. 813–820, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.02.022>

FERREIRA, C. J. A.; SILVA, D. A.; ALMEIDA, P. H.; SILVA, L. S. V.; CARVALHO, V. P.; COUTINHO, A. F.; PINHEIRO, F. G.; MAIA, R. P.; SILVA JUNIOR, G. B.; OLIVEIRA, R. A. Fatal disseminated strongyloidiasis after kidney transplantation. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, n.5, p. 652-654, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000500022>

FINKELMAN, F. D.; SHEA-DONOHUE, T.; GOLDHILL, J.; SULLIVAN, C. A.; MORRIS, S. C.; MADDEN, K. B.; GAUSE, W. C.; URBAN, J. F. Jr. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. **Annual Review of Immunology**, v.15, p.505–533, 1997. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.505>

FOGAÇA, H. S.; ELIA, C. C. S.; MADI, K.; OLIVEIRA, A. Estudo das imunoglobulinas intestinais na estrongiloidíase. **A Folha Médica**, v.101, p.229-235, 1990.

FRANK, M. M.; HESTER, C. G. Immune complexes: normal physiology and role in disease. In: PAWANKAR, R.; HOLGATE, S. T.; ROSENWASSER, L. J. **Allergy Frontiers: Classification and Pathomechanisms**. vol 2., Tokyo: Springer, 2009, p.79-94. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-88315-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-4-431-88315-9_6)

FURTADO, K. C. Y. O.; COSTA, C. A.; FERREIRA, L. S. C.; MARTINS, L. C.; LINHARES, A. C.; ISHIKAWA, E. A. Y.; BATISTA, E. J. O.; SOUSA, M. S. 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. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.46, n.2, p.241-243, 2013. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-981-2013>

GAUSE, W. C.; URBAN, J. F.; STADECKER, M. J. The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. **Trends in Immunology**, v.24, n.5, p.269-277, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00101-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00101-7)

GENTA, R. M. Dysregulation of strongyloidiasis: a new hypothesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.5, p. 345-355, 1992. <https://doi.org/10.1128/CMR.5.4.345>

GETANEH, A.; MEDHIN, G.; SHIMELIS, T. *Cryptosporidium* and *Strongyloides stercoralis* infection among people with and without HIV infection and efficiency of diagnostic methods for *Strongyloides* in Yirgalem Hospital, southern Ethiopia. **BMC Research Notes**, v. 3, p.1-6, 2010. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-90>

GHASEMIKHAH, R.; TABATABAIEFAR, M. A.; SHARIATZADEH, S. A.; SHAHBAZI, A.; HAZRATIAN, T. A PCR-based molecular detection of *Strongyloides stercoralis* in human stool samples from Tabriz city, Iran. **Scientia Pharmaceutica**, v.85, n.2, pii E17, 2017. <https://doi.org/10.3390/scipharm85020017>

GHEORGHIU, M; BĂRĂ, C.; PASARICA, D.; BRASOVEANU, L.; BLEOTU, C.; TOPĂRCEANU, F.; TRANDAFIR, T.; DIACONU, C. C. Ethanol-induced dysfunction of hepatocytes and leukocytes in patients without liver failure. **Roumanian Archives of Microbiology and Immunology**, v.63, n.1-2, p.5-33, 2004.

GIOVANELLA, L; MENDONÇA, M. M. H. Atenção primária à saúde. In: GIOVANELLA, L.; ESCOREL, S.; LOBATO, L. V. C.; NORONHA, J. C.; CARVALHO, A. I. **Políticas e Sistema de Saúde no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2008. p. 575-626.

GLASSMAN, A. B.; BENNETT, C. E.; RANDALL, C. L. Effects of ethyl alcohol on human peripheral lymphocytes. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v.109, n.6, p.540-542, 1985.

GOKA, A. K.; ROLSTON, D. D.; MATHAN, V. I.; FARTHING, M. J. Diagnosis of *Strongyloides* and hookworm infections: comparison of faecal and duodenal fluid microscopy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.84, n.6, p. 829-831, 1990. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(90\)90098-Y](https://doi.org/10.1016/0035-9203(90)90098-Y)

GOLDHILL, J.; MORRIS, S. C.; MALISZEWSKI, C.; URBAN, J. F. Jr; FUNK, C. D.; FINKELMAN, F. D.; SHEA-DONOHUE, T. Interleukin-4 modulates cholinergic neural control of mouse small intestinal longitudinal muscle. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. 1135-1140, 1997.

GONÇALVES, A. L. R.; RODRIGUES, R. M.; SILVA, N. M.; GONÇALVES, F. A.; CARDOSO, C. R.; BELETTI, M. E.; UETA, M. T.; SILVA, J. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Immunolocalization and pathological alterations following *Strongyloides venezuelensis* infection in the lungs and the intestine of MHC class I or II deficient mice. **Veterinary Parasitology**, v.158, n.4, p.319-328, 2008.

GONÇALVES, A. L. R.; SILVA, C. V.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. A new faecal antigen detection system for *Strongyloides venezuelensis* diagnosis in immunosuppressed rats. **Experimental Parasitology**, v.125, n.4, p.338-341, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.02.015>

GONÇALVES, A. L. R.; NUNES, D. S.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Use of larval, parasitic female and egg antigens from *Strongyloides venezuelensis* to detect parasite-specific IgG and immune complexes in immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Parasitology**, v.139, n.7, p.956-961, 2012a. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000054>

GONÇALVES, A. L. R.; SILVA, C. V.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Antigen, antibody and immune complex detection in serum samples from rats experimentally infected with *Strongyloides venezuelensis*. **Experimental Parasitology**, v.130, n.3, p. 205-208, 2012b. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.01.007>

GONÇALVES, A. L. R.; de ARAÚJO, K. C. L.; CARVALHO, E. F. G.; UETA, M. T., COSTA-CRUZ, J. M. Specific IgG and immune complex responses to parthenogenetic females and eggs of nematode *Strongyloides venezuelensis* for the diagnosis of immunosuppression in infected rats. **Journal of Helminthology**, v.90, n.3, p.342-346, 2016. <https://doi.org/10.1017/S0022149X15000346>

GONZAGA, H. T.; RIBEIRO, V. S.; FELICIANO, N. D.; MANHANI, M. N.; SILVA, D. A.; UETA, M. D.; COSTA-CRUZ, J. M. IgG avidity in diferencial serodiagnosis of human strongyloidiasis active infection. **Immunology Letters**, v.139, n.1-2, p.87-92, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2011.05.006>

GONZALES-QUINTELA, A.; GUDE, F.; BOQUETE, O.; REY, J.; MEIJIDE, L. M.; SUAREZ, F.; FERNÁNDEZ-MERINO, M. C.; PÉREZ, L. F.; VIDAL, C. Association of alcohol consumption with total serum immunoglobulin E levels and allergic sensitization in an adult population-based survey. **Clinical and Experimental Allergy**, v.33, n.2, p.199-205, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2003.01582.x>

GONZALES-QUINTELA, A.; ALENDE, R.; GUDE, F.; CAMPOS, J.; REY, J.; MEIJIDE, L. M.; FERNANDEZ-MERINO, C.; VIDAL, C. Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. **Clinical and Experimental Immunology**, v.151, n.1, p.42-50, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03545.x>

GOTUZZO, E.; TERASHIMA, A.; ALVAREZ, H.; TELLO, R.; INFANTE, R.; WATTS, D. M.; FREEDMAN, D. O. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection associated with human T cell lymphotropic virus type-1 infection in Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n.1, p.146-149, 1999. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.146>

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; LEITE, C. S.; SPERHACKE, C. L.; FASSINA, K.; PETRY, S. M.; MUCENIC, T.; PANDOLFI, C.; BARCELLOS, S.; JOB, F. Prospective study of strongyloidosis in patients with hematologic malignancies. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, n.5, p.355–357, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821997000500001>

GROVE, D. I. Human strongyloidiasis. **Advances in Parasitology**, v. 38, p.251-309, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60036-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60036-6)

GUTIÉRREZ, J.; MAROTO, C. Are IgG antibody avidity assays useful in the diagnosis of infectious diseases? A review. **Microbios**, v. 87, p. 113-121, 1996.

HIRA, P. R.; AL-ALI, F.; SHWEIKI, H. M.; ABDELLA, N. A.; JOHNY, M.; FRANCIS, I.; IQBAL, J.; THOMPSON, R.; NEVA, F. Strongyloidiasis: challenges in diagnosis and management in non-endemic Kuwait. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 98, p. 261-270, 2004. <https://doi.org/10.1179/000349804225003299>

HIRATA, T.; UCHIMA, N.; KISHIMOTO, K.; ZAHA, O.; KINJO, N.; HOKAMA, A.; SAKUGAWA, H.; KINJO, F.; FUJITA, J. Impairment of host immune response against *Strongyloides stercoralis* by human T cell lymphotropic virus type 1 infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.74, n.2, p. 246-249, 2006.

HIRATA, T.; NAKAMURA, H.; KINJO, N.; HOKAMA, A.; KINJO, F.; YAMANE, N.; FUJITA, J. Increased detection rate of *Strongyloides stercoralis* by repeated stool examinations using the agar plate culture method. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.77, n.4, p. 683-684, 2007.

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

HOLGUIN, F.; MOSS, I. M.; BROWN, L. A. S.; GUIDOT, D. M. Chronic ethanol ingestion impairs alveolar type II cell glutathione homeostasis and function and predisposes to endotoxin-mediated acute edematous lung injury in rats. **The Journal of Clinical Investigation**, v.101, n.4, p.761-768, 1998. <https://doi.org/10.1172/JCI1396>

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Demográfico 2010: Características gerais da população, religião e pessoas com deficiência**. IBGE, Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: [http://.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas\\_religiao\\_deficiencia/default\\_caracteristicas\\_religiao\\_deficiencia.shtm](http://.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_religiao_deficiencia/default_caracteristicas_religiao_deficiencia.shtm). Acesso em: 02 agosto 2017.

IDHMB – Índice de desenvolvimento humano municipal brasileiro - **Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil**. Brasília, DF: PNDU, 96p, 2013.

INÊS, E. de J.; SOUZA, J. N.; SANTOS, R. C.; SOUZA, E. S.; SANTOS, F. L.; SILVA, M. L. S.; SILVA, M. P.; TEIXEIRA, M. C. A.; SOARES, N. M. Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. **Acta Tropica**, v.120, n.3, p.206–210, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.08.010>

INÊS, E. de J.; SILVA, M. L. S.; SOUZA, J. N.; TEIXEIRA, M. C. A.; SOARES, N. M. The role of glycosylated epitopes in the serodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.76, n.1, p.31–35, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.01.016>

INTAPAN, P. M.; MALEEWONG, W.; WONGSAROJ, T.; SINGTHONG, S.; MORAKOTE, N. Comparison of the quantitative formalin ethyl acetate concentration technique and agar plate culture for diagnosis of human strongyloidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.4, p.1932-1933, 2005. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1932-1933.2005>

IRIEMENAM, N. C.; SANYAOLU, A. O.; OYIBO, W. A.; FAGBENRO-BEYIOKU, A. F. *Strongyloides stercoralis* and the immune response. **Parasitology International**, v.59, n.1, p.9-14, 2010.

ITURRY-YAMAMOTO, G. R.; PORTINHO, C. P. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.47, n.1, p.41-51, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302001000100029>

JENUN, P. A.; STRAY-PEDERSEN, B.; GUNDERSEN, A. G. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.8, p.1972-1977, 1997.

JERRELLS, T. R. Immunodeficiency associated with ethanol abuse. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 288, p.229-236, 1991. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5925-8\\_26](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5925-8_26)

JERRELLS, T. R.; MARIETTA, C. A.; WEIGHT, F. F.; ECKARDT, M. J. Effect of adrenalectomy on ethanol-associated immunosuppression. **International Journal of Immunopharmacology**, v.12, n.4, p.435–442, 1990. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(90\)90027-K](https://doi.org/10.1016/0192-0561(90)90027-K)

JOHNSON, A.; HARKIN, S.; STEWARD, M. W.; WHALEY, K. The effects of immunoglobulin isotype and antibody affinity on complement-mediated inhibition of immune precipitation and solubilization. **Molecular Immunology**, v.24, n.11, p.1211-1217, 1987. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(87\)90168-4](https://doi.org/10.1016/0161-5890(87)90168-4)

JUCHEMS, M. S.; NIESS, J. H.; LEDER, G.; BARTH, T. F.; ADLER, G.; BRAMBS, H. J.; WAGNER, M. *Strongyloides stercoralis*: a rare cause of obstructive duodenal stenosis. **Digestion**, v.77, n.3-4, p.141-144, 2008. <https://doi.org/10.1159/000128597>

KAHN, M. N.; DASS, P.D.; LEETE, J.H.; SHUMAN, R. F.; GUNSIOR, M.; SADHU, C. Development of ligand-binding assays for drug development support. In: KAHN, M. N.; FINDLAY, J. W. **Ligand-binding assays: development, validation, and implementation in the drug development arena**. 1ed. Indianápolis: John Wiley and Sons, 2009. p.39-58. <https://doi.org/10.1002/9780470541517.ch3>

KAKATI, B.; DANG, S.; HEIF, M.; CARADINE, K.; MCKNIGHT, W.; ADULI, F. *Strongyloides* duodenitis: case report and review of literature. **Journal of the National Medical Association**, v.103, n.1, p.60-63, 2011. [https://doi.org/10.1016/S0027-9684\(15\)30246-7](https://doi.org/10.1016/S0027-9684(15)30246-7)

KEISER, P. B.; NUTMAN, T. B. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, n.1, p.208–217, 2004. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.208-217.2004>

KEREPESI, L. A.; HESS, J. A.; LEON, O.; NOLAN, T. J.; SCHAD, G. A.; ABRAHAM, D. Toll-like receptor 4 (TLR4) is required for protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Microbes and Infection**, v.9, n.1, p.28-34, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.10.003>

KERSHAW, C. D.; GUIDOT, D. M. Alcoholic lung disease. **Alcohol Research and Health**, v.31, n.1, p.66-75, 2008.

KHIEU, V.; SCHÄR, F.; FORRER, A.; HATTENDORF, J.; MARTI, H.; DUONG, S.; VOUNATSOU, P.; MUTH, S.; ODERMATT, P. High prevalence and spatial distribution of *Strongyloides stercoralis* in rural Cambodia. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 8, n. 6, p.e2854, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002854>

KIM, J.; JOO, H. S.; KO, H. M.; NA, M. S.; HWANG, S. H.; IM, J. C. A case of fatal hyperinfective strongyloidiasis with discovery of autoinfective filariform larvae in sputum. **Korean Journal of Parasitology**, v.43, n.2, p.51-55, 2005. <https://doi.org/10.3347/kjp.2005.43.2.51>

KISHIMOTO, K.; HOKAMA, A.; HIRATA, T.; IHAMA, Y.; NAKAMOTO, M.; KINJO, N.; KINJO, F.; FUJITA, J. Endoscopic and histopathological study on the duodenum of *Strongyloides stercoralis* hyperinfection. **World Journal of Gastroenterology**, v.14, n.11, p.1768-1773, 2008. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.1768>

KLION, A. D.; NUTMAN, D. B. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.113, n.1, p.30-37, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.10.050>

KOBAYASHI, J.; HASEGAWA, H.; SOARES, E. C.; TOMA, H.; DACAL, A. R.; BRITO, M. C.; YAMANAKA, A.; FOLI, A. A.; SATO, Y. Studies on prevalence of *Strongyloides* infection in Holambra and Maceió, Brazil, by the agar plate faecal culture method. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, n.4, p.279–284, 1996. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651996000400007>

- KOGA, K.; KASUYA, S.; KHAMBOONRUANG, C.; SUKAVAT, K.; IEDA, M.; TAKATSUKA, N.; KITA, K.; OHTOMO, H. A. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, p. 518-521, 1991. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.45.518>
- KOTHARY, N. N.; MUSKIE, J. M.; MATHUR, S. C. *Strongyloides stercoralis* hiperinfection. **Radiographics**, v.19, n.4, p.1077-1081, 1999. <https://doi.org/10.1148/radiographics.19.4.g99jl171077>
- KRAMME, S., NISSEN, N., SOBLIK, H., ERTTMANN, K., TANNICH, E., FLEISCHER, B., PANNING, M., BRATTIG, N. Novel real-time PCR for the universal detection of *Strongyloides* species. **Journal of Medical Microbiology**, v.60, p.454–458, 2011. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.025338-0>
- LARANJEIRA, R; MADRUGA, C. S.; PINSKY, I.; CAETANO, R.; MITSUHIRO, S. S. **II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas: Relatório 2012**. São Paulo, 2014, 85p.  
Disponível em:  
<http://inpad.org.br/wp-content/uploads/2014/03/Lenad-IIRelat.pdf> acesso em: 10 de agosto de 2017.
- LEVENHAGEN, M. A.; COSTA-CRUZ, J. M. Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. **Acta Tropica**, v. 135, p. 33-43, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.03.015>
- LEVINE, N.D. **Nematode parasites of domestic animals and of man**. 2.ed. Minneapolis: Burgess, p. 427, 1979.
- LI, X.; RANA, S. N.; SCHWACHA, M. G.; CHAUDRY, I. H.; CHOUDHRY, M. A. 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**, v.80, n.2, p.367–375, 2006. <https://doi.org/10.1189/jlb.1205745>
- LINDEN, S. K.; SUTTON, P.; KARLSSON, N. G.; KOROLIK, V.; MCGUCKIN, M. A. Mucins in the mucosal barrier to infection. **Mucosal Immunology**, v.1, n.3, p.183-197, 2008. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.5>
- LINDO, J. F.; CONWAY, D. J.; ATKINS, N. S.; BIANCO, A. E.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A. P. Prospective evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot methods for the diagnosis of endemic *Strongyloides stercoralis* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n.2, p. 175-179, 1994. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.51.175>
- LINDO, J. F.; ATKINS, N. S.; LEE, M. G.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A. Parasite-specific serum IgG following successful treatment of endemic strongyloidiasis using ivermectin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.90, n.6, p.702-703, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(96\)90444-7](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(96)90444-7)
- LIU, L. X.; WELLER, P. F. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v. 37, n.3, p. 655-682, 1993.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n.1, p.265-275, 1951.

LUCISANO-VALIM, Y. M.; LACHMANN, P. J. The effect of antibody isotype and antigenic epitope density on the complement-fixing activity of immune complexes: a systematic study using chimaeric anti-NIP antibodies with human Fc regions. **Clinical and Experimental Immunology**, v.84, n.1, p.1-8, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1991.tb08115.x>

LUVIRA, V.; TRAKULHUN, K.; MUNGTHIN, M.; NAAGLOR, T.; CHANTAWAT, N.; PAKDEE, W.; PHIBOONBANAKIT, D.; DEKUMYOY, P. Comparative diagnosis of strongyloidiasis in immunocompromised patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n.2, p.401-404, 2016. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0068>

MACHADO, E. R.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, n.2, p.161-164, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000200004>

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; ALVES-OLIVEIRA, J. B.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n.6, p. 849-851, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000600024>

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; LOURENÇO, E. V.; ANIBAL, F. F.; SORGI, C. A.; SOARES, E. G.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; MEDEIROS, A. I.; FACCIOLI, L. H. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. **Journal of Immunology**, v.175, n.6, p.3892-3899, 2005. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.6.3892>

MACHADO, E. R.; TEIXEIRA, E. M.; GONCALVES-PIRES, M. R. F.; LOUREIRO, Z. M.; ARAUJO, R. A.; COSTA-CRUZ, J. M. Parasitological and immunological diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in patients with gastrointestinal cancer. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 40, n.2, p. 154-158, 2008. <https://doi.org/10.1080/00365540701558730>

MAIER, A; BODE, C.; FRITZ, P.; BODE, J. C. Effects of chronic alcohol abuse on duodenal mononuclear cells in man. **Digestive Diseases and Sciences**, v.44, n.4, p.691–696, 1999. <https://doi.org/10.1023/A:1026697305769>

MALEK, T. R.; YU, A.; ZHU, L.; MATSUTANI, T.; ADEEGBE, D.; BAYER, A. L. IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. **Journal of Clinical Immunology**, v.28, n.6, p.635–639, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10875-008-9235-y>

MARCOS, L. A.; TERASHIMA, A.; DUPONT, H. L.; GOTUZZO, E. *Strongyloides* hiperinfection syndrome: an emerging global infectious disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, n.4, p. 314-318, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.01.020>



- MARCOS, L. A.; TERASHIMA, A.; CANALES, M.; GOTUZZO, E. Update on strongyloidiasis in the immunocompromised host. **Current Infectious Disease Report**, v. 13, n. 1, p. 35-46, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11908-010-0150-z>
- MARQUES, C. C.; ZAGO-GOMES, M. P.; GONÇALVES, C. S.; PEREIRA, F. E. L. Alcoholism and *Strongyloides stercoralis*: daily ethanol ingestion has a positive correlation with the frequency of *Strongyloides* larvae in the stools. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.4, n.6, p. e717, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000717>
- MARUYAMA, H.; YABU, Y.; YOSHIDA, A.; NAWA, Y.; OHTA, N. A. A role of mast cell glycosaminoglicans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **Journal of Immunology**, v.164, n.7, p.3749-3754, 2000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.7.3749>
- MARUYAMA, H.; NISHIMAKI, A.; TAKUMA, Y.; KURIMOTO, M.; SUZUKI, T.; SAKATOKU, Y.; ISHIKAWA, M.; OHTA, M. Successive changes in tissue migration capacity of developing larvae of an intestinal nematode *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology**, v.132, n.3, p.411-418, 2006. <https://doi.org/10.1017/S0031182005009042>
- MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Clearance de imunocomplexos: papel do complemento e dos polimorfonucleares neutrófilos. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.30, n.2, p.234-242, 1997.
- MASCARINI-SERRA, L. M.; TELLES, C. A.; PRADO, M. S.; MATTOS, S. A.; STRINA, A.; ALCANTARA-NEVES, N. M.; BARRETO, M. L. Reductions in the prevalence and incidence of geohelminth infections following a city-wide sanitation program in a Brazilian Urban Centre. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.4, n.2, p. e558, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000588>
- MASTERS, S. O. **Os álcoois**. In: KATZUNG, B. G. Farmacologia básica e clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 8 ed. 2003, p.334-340.
- MAZHAR, M.; ALI, I. A.; AGUDELO HIGUITA, N. I. *Strongyloides* hiperinfection in a renal transplant patient: always be on the lookout. **Case Reports in Infectious Diseases**, v.2017, 2953805, 2017.
- McDONALD, H. H.; MOORE, M. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection. **The New England Journal of Medicine**, v.376, n.24, p.2376, 2017. <https://doi.org/10.1056/NEJMicm1612018>
- McDOUGAL, J. S.; McDUFFIE, F. C. Immune complexes in man: detection and clinical significance. **Advances in Clinical Chemistry**, v.24, p.1-60, 1985. [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(08\)60270-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(08)60270-X)
- McMILLAN, S. A.; DOUGLAS, J. P.; ARCHBOLD, G. P. R.; McCRUM, E. E.; EVANS, A. E. Effect of low to moderate levels of smoking and alcohol consumption on serum immunoglobulin concentrations. **Journal of Clinical Pathology**, v.50, n.10, p.819-822, 1997. <https://doi.org/10.1136/jcp.50.10.819>

- MEJIA, R.; NUTMAN, T. B. Screening, prevention and treatment for hiperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*. **Current Opinion in Infectious Disease**, v.25, n.4, p.458-463, 2012. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283551dbd>
- MELONI, J. N.; LARANJEIRA, R. The social and health burden of alcohol abuse. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, supl 1, p. S7–10, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1516-44462004000500003>
- MENDES, T.; MINORI, K.; UETA, M.; MIGUEL, D. C.; ALLEGRETTI, S. M. Strongyloidiasis current status with emphasis in diagnosis and drug research. **Journal of Parasitology Research**, v.2017, p.5056314, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5056314>
- MENDONÇA, S. C. L.; GONÇALVES-PIRES, M. do R. F.; RODRIGUES, R. M.; FERREIRA Jr, A.; COSTA-CRUZ, J. M. Is there an association between positive *Strongyloides stercoralis* serology and diabetes mellitus? **Acta Tropica**, v. 99, n. 1, p. 102-105, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.06.006>
- MILI, F.; FLANDERS, W. D.; BORING, J. R.; ANNEST, J. L.; DeSTEFANO, F. The associations of alcohol drinking and drinking cessation to measures of the immune system in middle-aged men. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v.16, n.4, p.688-694, 1992. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1992.tb00662.x>
- MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Medidas de Biossegurança em Pesquisa na Área Biomédica**. In: Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação. 1ª ed, ed. EDUFU, p. 81-111, 2005.
- MITTAL, S.; SAGI, S. V.; HAWARI, R. Strongyloidiasis: endoscopic diagnosis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.7, n.2, p.e8, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2008.08.045>
- MOLINA, P. E.; HAPPEL, K. I.; ZHANG, P.; KOLLS, J. K.; NELSON, S. Focus on: alcohol and the immune system. **Alcohol Research and Health**, v.33, n.1-2, p.97–108, 2010.
- MONCADA, D. M.; KAMMANADIMINTI, S. J.; CHADEE, K. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. **Trends in Parasitology**, v.19, n.7, p.305-311, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(03\)00122-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00122-3)
- MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da strongiloidíase no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.1, p.507-624, 1948.
- MOTA-FERREIRA, D. M. L.; GONÇALVES-PIRES, M. do R. F.; JÚNIOR, A. F.; SOPELETE, M. C.; ABDALLAH, V. O. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Specific IgA and IgG antibodies in paired serum and breast milk samples in human strongyloidiasis. **Acta Tropica**, v.109, n.2, p.103–107, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.09.023>
- NAAMA, J. K.; HAMILTON, A. O.; YEUNG-LAIWAHT, A. C.; WHALEY, K. Prevention of immune precipitation by purified classical pathway complement components. **Clinical and Experimental Immunology**, v.58, n.2, p.486-492, 1984.

- NEGRÃO-CORRÊA, D. 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**, v.43, n.5, p.291-299, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652001000500011>
- NEGRÃO-CORRÊA, D.; TEIXEIRA, M. M. The mutual influence of nematode infection and allergy. **Chemical Immunology and Allergy**, v.90, p.14-28, 2006.
- NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. 13.ed, São Paulo: Atheneu, 2016. 588p.
- NEWBERRY, A. M.; WILLIAMS, D. N.; STAUFFER, W. M.; BOULWARE, D. R.; HENDEL-PATERSON, B. R.; WALKER, P. F. *Strongyloides* hyperinfection presenting as acute respiratory failure and gram-negative sepsis. **Chest**, v.128, n.5, p. 3681–3684, 2005. <https://doi.org/10.1378/chest.128.5.3681>
- NUTMAN, T. B. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. **Parasitology**, v.144, n.3, p.263-273, 2017. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000834>
- OBASI, E. M.; SHIRTCLIFF, E. A.; BRODY, G. H.; MACKILLOP, J.; PITTMAN, D. M.; CAVANAGH, L.; PHILIBERT, R. A. The relationship between alcohol consumption, perceived stress, and CRHR1 genotype on the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in rural African americans. **Frontiers in Psychology**, v.6, p.832, 2015. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.00832>
- OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo; Atheneu. 2 ed. 2003. p.273-283.
- OHYAMA, K.; HUY, N. T.; YOSHIMI, H.; KISHIKAWA, N.; NISHIZAWA, J. E.; ROCA, Y.; REVOLLO GUZMÁN, R. J.; VELARDE, F. U. G.; KURODA, N.; HIRAYAMA, K. Proteomic profile of circulating immune complexes in chronic Chagas disease. **Parasite Immunology**, v.38, n.10, p.609-617, 2016. <https://doi.org/10.1111/pim.12341>
- OLIVEIRA, L. C. M.; RIBEIRO, C. T.; MENDES, D. M.; OLIVEIRA, T. C.; COSTACRUZ, J. M. Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.1, p.119-121, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000100021>
- OLSEN, A.; Van LIESHOUT, L.; MARTI, H.; POLDERMAN, T.; POLMAN, K.; STEINMANN, P.; STOTHARD, R.; THYBO, S.; VERWEIJ, J. J.; MAGNUSSEN, P. Strongyloidiasis - the most neglected of the neglected tropical diseases? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.103, n.10, p.967-972, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.02.013>
- ONAH, D. N.; NAWA, Y. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. **The Korean Journal of Parasitology**, v.38, n.4, p.209-236, 2000. <https://doi.org/10.3347/kjp.2000.38.4.209>

ONUIGBO, M. A. C.; IBEACHUM, G. I. *Strongyloides stercoralis* larvae in peripheral blood. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.85, n.1, p.97, 1991. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(91\)90174-W](https://doi.org/10.1016/0035-9203(91)90174-W)

OSTERA, G.; BLUM, J. Strongyloidiasis: risk and healthcare access for Latin American immigrants living in the United States. **Current Tropical Medicine Reports**, v.3, p.1-3, 2016. <https://doi.org/10.1007/s40475-016-0065-3>

OUDE LASHOF, A. O.; LESTERHUIS, W. J.; WANTEN, G.; BECKERS, P.; KEUTER, M. Coliti in an alcohol-dependent woman. **The Lancet**, v.369, n.9578, p.2050, 2007. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60945-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60945-3)

PAGE, W.; SPEARE, R. Chronic strongyloidiasis – don't look and you won't find. **Australian Family Physician**, v.45, n.1, p.40-44, 2016.

PASALA, S.; BARR, T.; MESSAOUDI, I. Impact of alcohol abuse on the adaptive immune system. **Alcohol Research: Current Reviews**, v.37, n.2, p.185-197, 2015.

PAULA, F. M.; COSTA-CRUZ, J. M. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. **Parasitology**, v. 138, n.11, p. 1331-1340, 2011. <https://doi.org/10.1017/S003118201100120X>

PAULA, F.M.; CASTRO, E. D.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; MARÇAL, M. G.; CAMPOS, D. M. B.; COSTA-CRUZ, J. M. 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 São Paulo**, v.42, n.1, p.51-55, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652000000100009>

PAULA, F. M.; MALTA, F. M.; CORRAL, M. A.; MARQUES, P. D.; GOTTARDI, M.; MEISEL, D. M.; YAMASHIRO, J.; PINHO, J. R.; CASTILHO, V. L.; GONÇALVES, E. M.; GRYSCHKEK, R. C.; CHIEFFI, P. P. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection in immunocompromised patients by serological and molecular methods. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.58, n.9, p.67, 2016. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658063>

PINLAOR, S.; MOOTSIKAPUN, P.; PINLAOR, P.; PIPITGOOL, V.; TUANGNADEE, R. Detection of opportunistic and non-opportunistic intestinal parasites and liver flukes in HIV-positive and HIV-negative subjects. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 36, n.4, p. 841-845, 2005.

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

POCHINENI, V.; LAL, D.; HASNAYEN, S.; RESTREPO, E. Fatal strongyloidiasis hyperinfection syndrome in an immunocompromised patient. **American Journal of Case Reports**, v. 16, p.603-605, 2015. <https://doi.org/10.12659/AJCR.894110>

PORTO, A. F.; NEVA, F. A.; BITTENCOURT, H.; LISBOA, W.; THOMPSON, R.; ALCÂNTARA, L.; CARVALHO, E. M. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. **Parasite Immunology**, v.23, n.9, p. 503-507, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2001.00407.x>

PORTO, M. A. F.; MUNIZ, A.; OLIVEIRA Jr, O.; CARVALHO, E. M. Implicações clínicas e imunológicas da associação entre o HTLV-1 e a estrogiloidíase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.6, p.641-649, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822002000600016>

PUTHIYAKUNNON, S.; BODDU, S.; LI, Y.; ZHOU, X.; WANG, C.; LI, J.; CHEN, X. Strongyloidiasis - an insight into its global prevalence and management. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.8, p.e3018, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003018>

RAMACHANDRAN, S.; THOMPSON, R. W.; GAM, A. A.; NEVA, F. A. Recombinant cDNA clones for immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Journal of Infectious Disease**, v. 177, n. 1, p. 196-203, 1998. <https://doi.org/10.1086/513817>

RAO, R. K.; SETH, A.; SHETH, P. Recent advances in alcoholic liver disease. I. Role of intestinal permeability and endotoxemia in alcoholic liver disease. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.286, n.6, p.881-884, 2004. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00006.2004>

RAVI, V.; RAMACHANDRAN, S.; THOMPSON, R. W.; ANDERSEN, J. F.; NEVA, F. A. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 125, n. 1-2, p. 73-81, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00214-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00214-1)

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 Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.1, p.e2002, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002002>

REPETTO, S. A.; RUYBAL, P.; SOLANA, M. E.; LÓPEZ, C.; BERINI, C. A.; ALBA SOTO, C. D.; CAPPÀ, S. M. G. Comparison between PCR and larvae visualization methods for diagnosis of *Strongyloides stercoralis* out of endemic area: a proposed algorithm. **Acta Tropica**, v. 157, p.169-177, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.02.004>

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

REYES, F.; SINGH, N.; ANJUMAN-KHURRAM, N.; LEE, J.; CHOW, L. *Strongyloides* hyperinfection syndrome causing fatal meningitis and septicemia by *Citrobacter koseri*. **ID Cases**, v.10, p.102-104, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2017.09.005>

RIBEIRO, V. S.; FELICIANO, N. D.; GONZAGA, H. T.; COSTA, I. N.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Detergent fraction of heterologous antigen to detect IgA and IgG in strongyloidiasis using saliva and serum paired samples. **Immunology Letters**, v.134, n.1, p.69-74, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2010.08.011>

RIGO, C. R.; LESCANO, S. Z.; MARCHI, C. R.; AMATO NETO, V. Avaliação da resposta imune humoral frente a antígenos de *Strongyloides venezuelensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.6, p.648-653, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000600017>

RIOS, J. T.; FRANCO, M. C.; MARTINS, B. C.; BABA, E. R.; SAFATLE-RIBEIRO, A. V.; SAKAI, P. RETES, F. A.; MALUF-FILHO, F. *Strongyloides stercoralis* hiperinfection: an unusual cause of gastrointestinal bleeding. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.61, n.4, p.311-312, 2015. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.61.04.311>

RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. **Bulletin of the National Service of Army-Medical Department**, v.8, p.326-334, 1948.

RODRIGUES, R. M.; DE OLIVEIRA, M. C.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A.; CAMPOS, D. M.; TAKETOMI, E. A.; COSTA-CRUZ, J. M. IgG1, IgG4 and IgE antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen. **Parasitology Research**, v.101, n.5, p.1209-1214, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0602-z>

RODRIGUES, R. M.; SILVA, N. M.; GONÇALVES, A. L. R.; CARDOSO, C. R.; ALVES, R.; GONÇALVES, F. A.; BELETTI, M. E.; UETA, M. T.; SILVA, J.; COSTA-CRUZ, J. M. Major histocompatibility complex (MHC) class II but not MHC class I molecules are required for efficient control of *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. **Immunology**, v.128, n.1, p.432-441, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02995.x>

ROSSI, C. L.; TAKAHASHI, E. E.; PARTEL, C. D.; TEODORO, L. G. V. L.; SILVA, L. J. Total serum IgE and parasite-specific IgG and IgA antibodies in human strongyloidiasis. **Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v.35, n.4, p.361-365, 1993. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651993000400010>

ROTHER, K.; TILL, G.; HANSCH, G. M. The complement system. 2ed. Berlin: Springer, 1998. 564p.

ROXBY, A. C.; GOTTLIEB, G. S.; LIMAYE, A. P. Strongyloidiasis in transplant patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n.9, p.1411-1423, 2009. <https://doi.org/10.1086/630201>

RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de nematoides das fezes – modificação do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.14, p.5-8, 1954.

SAMMET, S.; WIESER, A.; MÜLLER, S; HUBER, M.; SCHUBERT, S.; SEYBOLD, U. Triple worm infestation in an HIV-infected patient. **Infection**, v.41, n.5, p.1053-1054, 2013. <https://doi.org/10.1007/s15010-013-0480-5>

SANDERSON, I. R.; WALKER, W. A. Mucosal barrier. In: **Mucosal Immunology**. Academic Press, 2ed, v.5, p.17, 1999.

SATO, Y.; INOUE, F.; MATSUYAMA, R.; SHIROMA, Y. Immunoblot analysis of antibodies in human strongyloidiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.84, n.3, p.403–406, 1990. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(90\)90337-E](https://doi.org/10.1016/0035-9203(90)90337-E)

SATO, Y.; KOBAYASHI, J.; TOMA, H.; SHIROMA, Y. Efficacy of stool examination for detection of *Strongyloides* infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.53, n.3, p.248–250, 1995. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.53.248>

SCHAFFEL, R.; NUCCI, M.; CARVALHO, E.; BRAGA, M.; ALMEIDA, L.; PORTUGAL., R.; PULCHERI, W. The value of an immunoenzymatic test (enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients immunosuppressed by hematologic malignancies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.65, n.4, p.346-350, 2001. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.346>

SCHÄR, F.; TROSTDORF, U.; GIARDINA, F.; KHIEU, V.; MUTH, S.; MARTI, H.; VOUNATSOU, P.; ODERMATT, P. *Strongyloides stercoralis*: global distribution and risk factors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.7, p.e2288, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002288>

SIDDIQUI, A. A.; BERK, S. L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n.7, p.1040–1047, 2001. <https://doi.org/10.1086/322707>

SIEGEL, M. O.; SIMON, G. L. Is human immunodeficiency virus infection a risk factor for *Strongyloides stercoralis* hyperinfection and dissemination? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.6, n.7, p.e1581, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001581>

SIGGINS, R.W.; BAGBY, G. J.; MOLINA, P.; DUFOUR, J.; NELSON, S.; ZHANG, P. Alcohol exposure impairs myeloid dendritic cell function in *Rhesus* macaques. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v.33, n.9, p.1524-1531, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2009.00980.x>

SILVA, D. A. O.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W. P.; PAJUABA NETO, A. A.; FERRO, E. A. V.; MINEO, J. R. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Veterinary Parasitology**, v.107, n.3, p.181-195, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00132-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00132-2)

SILVA, C. V.; FERREIRA, M. S.; BORGES, A. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients: experience at a teaching hospital in central Brazil. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.37, n.3, p.211-215, 2005. <https://doi.org/10.1080/00365540410020875>

SILVA, H.; CARVALHO, C. J. V.; LEVENHAGEN, M. A.; COSTA-CRUZ, J. M. The detergent fraction is effective in the detection of IgG anti-*Strongyloides stercoralis* in serum samples from immunocompromised individuals. **Parasitology International**, v.63, n.6, p.790-793, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.07.005>

SILVA, M. L. S.; INÊS, E. J.; SOUZA, A. B. S.; DIAS, V. M. S.; GUIMARÃES, C. M.; MENEZES, E. R.; BARBOSA, L. G.; ALVES, M. D. C. M.; TEIXEIRA, M. C. A.; SOARES, N. M. Association between *Strongyloides stercoralis* infection and cortisol secretion in alcoholic patients. **Acta Tropica**, v. 154, p.133-138, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.11.010>

SITTA, R. B.; MALTA, F. M.; PINHO, J. R.; CHIEFFI, P. P.; GRYSCHKEK, R. C.; PAULA, F. M. Conventional PCR for molecular diagnosis of human strongyloidiasis. **Parasitology**, v.141, n.5, p.716-721, 2014. <https://doi.org/10.1017/S0031182013002035>

SNIS – Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento – **Ranking do Saneamento Instituto Trata Brasil**. São Paulo, 2016, 110p.

- SUDRÉ, A. P.; MACEDO, H. W. de; PERALTA, R. H. S.; PERALTA, J. M. Diagnóstico da estrogiloidíase humana: Importância e técnicas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, p. 173-184, 2006.
- SZABO, G.; MANDREKAR, P. A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v.33, n.2, p.220–232, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00842.x>
- TAO, M. H.; SMITH, R. I. F.; MORRISON, S. L. Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation. **Journal of Experimental Medicine**, v.178, n.2, p.661-667, 1993. <https://doi.org/10.1084/jem.178.2.661>
- 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. Asymptomatic *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in an alcoholic patient with intense anemia. **The Journal of Parasitology**, v.96, n.4, p.833–835, 2010. <https://doi.org/10.1645/GE-2358.1>
- TEIXEIRA, M. C. A.; PACHECO, F. T. F.; SOUZA, J. N.; SILVA, M. L. S.; INÊS, E. J.; SOARES, N. M. *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholic patients. **BioMed Research International**, v.2016, p.4872473, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4872473>
- THANCHOMNANG, T.; INTAPAN, P. M.; SANPOOL, O.; RODPAI, R.; TOURTIP, S.; YAHOM, S.; KULLAWAT, J.; RADOMYOS, P.; THAMMASIRI, C.; MALEEWONG, W. First molecular identification and genetic diversity of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides fuelleborni* in human communities having contact with long-tailed macaques in Thailand. **Parasitology Research**, v.116, n.7, p.1917-1923, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5469-z>
- THAYER, J. F.; HALL, M.; SOLLERS, J. J.; FISCHER, J. E. 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**, v.59, n.3, p.244–250, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2005.10.013>
- THOMPSON, F. J.; MITREVA, M.; BARKER, G. L.; MARTIN, J.; WATERSON, R. H.; McCARTER, J. P.; VINEY, M. E. An expressed sequence tag analysis of the life-cycle of the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.142, n.1, p.32-46, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.03.006>
- TOLEDO, R.; MUÑOZ-ANTOLI, C.; ESTEBAN, J. G. Strongyloidiasis with emphasis on human infections and its different clinical forms. **Advances in Parasitology**, v.88, p.165-241, 2015. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2015.02.005>
- TRAJMAN, A; MacDONALD, T. T.; ELIA, C. C. S. Intestinal immune cells in *Strongyloides stercoralis* infection. **Journal of Clinical Pathology**, v.50, n.12, p.991-995, 1997. <https://doi.org/10.1136/jcp.50.12.991>
- UPADHYAY, D.; CORBRIDGE, T.; JAIN, M.; SHAH, R. Pulmonary hyperinfection syndrome with *Strongyloides stercoralis*. **American Journal of Medicine**, v.111, p.167-169, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(01\)00708-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(01)00708-2)



- UPARANUKRAW, P.; PHONGSRI, S.; MORAKOTE, N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.60, n.6, p.967-973, 1999. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.967>
- VADLAMUDI, R. S.; CHI, D. S.; KRISHNASWAMY, G. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. **Clinical and Molecular Allergy**, v.4, n.1, p.8, 2006. <https://doi.org/10.1186/1476-7961-4-8>
- VALAR, C.; KEITEL, E.; DAL PRÁ, R. L.; GNATTA, D.; SANTOS, A. F.; BIANCO, P. D.; SUKIENNIK, T. C. T.; PEGAS, K. L.; BITTAR, A. E.; OLIVEIRA, K. T.; GARCIA, V. D. Parasitic infection in renal transplant recipients. **Transplantation Proceedings**, v.39, n.2, p.460-462, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2007.01.025>
- van DOOR, H. R.; KOELEWYN, R.; HOFWEGEN, H.; GILIS, H.; WETSTEYN, J. C.; WISMANS, P. J.; SARFATI, C.; VERVOORT, T.; van GOOL, T. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for *Strongyloides stercoralis* infection in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.438-442, 2007. <https://doi.org/10.1128/JCM.01735-06>
- van EGMOND, M.; DAMEN, C. A.; van SPRIEL, A.B.; VIDARSSON, G.; van GARDEREN, E.; van DE WINKEL, J. G. IgA and the IgA Fc receptor. **Trends in Immunology**, v.22, n.4, p.205-211, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)01873-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)01873-7)
- VAZQUEZ GUILLAMET, L. J. V.; SAUL, Z.; MILJKOVIC, G., VILCHEZ, G. A.; MENDONCA, N.; GOURINENI, V.; LILLO, N.; PINTO, M.; BAIG, A.; GANGCUANGCO, L. M. *Strongyloides stercoralis* infection among human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients in the United States of America: A case report and review of literature. **The American Journal of Case Reports**, v. 18, p. 339-346, 2017. <https://doi.org/10.12659/AJCR.902626>
- VELOSO, M. G. P.; PORTO, A. S.; MORAES, M. Hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis*: relato de caso autopsiado. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 413-415, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000400018>
- VIANA, L. G.; RABELLO, A.; KATZ, N. Antibody subclass profile and avidity during acute and chronic human *Schistosoma mansoni* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.95, n.5, p.550-556, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(01\)90038-0](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(01)90038-0)
- VICENTE-GUTIÉRREZ, M. M.; DIEZ RUIZ, A.; GIL EXTREMERA, B.; BERMÚDEZ GARCÍA, J. M.; GUTIÉRREZ GEA, F. Low serum levels of alpha-interferon, gamma-interferon, and interleukin-2 in alcoholic cirrhosis. **Digestive Diseases and Sciences**, v.36, n.9, p.1209-1212, 1991. <https://doi.org/10.1007/BF01307510>
- VILELA, E. G.; CLEMENTE, W.T.; MIRA, R. R. L.; TORRES, H. O. G.; VELOSO, L. F.; FONSECA, L. P.; FONSECA, L. R. C.; FRANCA, M. d. C.; LIMA, A. S. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome after liver transplantation: case report and literature review. **Transplant Infectious Disease**, v.11, n.2, p.132-136, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2008.00350.x>

VON LINSTOW, O. *Strongyloides fülleborni* n. sp. **Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, 1. Abteilung Originale**, v. 38, p.532-533, 1905.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.14.5125>

WANG, L. J.; CAO, Y.; SHI, H.N. Helminth infections and intestinal inflammation. **World Journal of Gastroenterology**, v.14, n.33, p.5125-5132, 2008.  
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0596>

WANG, C.; XU, J.; ZHOU, X.; LI, J.; YANG, G.; JAMES, A.A.; CHEN, X.  
 Strongyloidiasis: an emerging infectious disease in China. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.88, n.3, p.420-425, 2013.

WEGENER, M.; SCHAFFSTEIN, J.; DILGER, U.; COENEN, C.; WEDMANN, B.; SCHMIDT, G. Gastrointestinal transit of solid-liquid meal in chronic alcoholics. **Digestive Diseases and Science**, v. 36, n.1, p.917-923, 1991. <https://doi.org/10.1007/BF01297141>

WHO, **Global Status Report on Alcohol and Health 2014**. Department of Mental Health and Substance Abuse, Geneva: 2014. Disponível em:  
 <[http://www.who.int/substance\\_abuse/publications/global\\_alcohol\\_report/msb\\_gsr\\_2014\\_1.pdf](http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msb_gsr_2014_1.pdf)> Acesso em: 01 de agosto 2017.

WHO, **Integrating neglected tropical diseases into global health and development : fourth WHO report on neglected tropical diseases**. Department of Control of Neglected Tropical Diseases, Geneva: 2017. Disponível em:  
[http://who.int/neglected\\_diseases/resources/9789241565448/en/](http://who.int/neglected_diseases/resources/9789241565448/en/) Acesso em: 25 de agosto de 2017.

WOOFF, J. M.; KERR, M. A. The function of immunoglobulin A in immunity. **The Journal of Pathology**, v.208, n.2, p.270-282, 2006. <https://doi.org/10.1002/path.1877>

YAMADA, M.; MATSUDA, S.; NAKAZAWA, M.; ARIZONO, N. Species-specific differences in heterogonic development of serially transferred free living generations of *Strongyloides planiceps* and *Strongyloides stercoralis*. **The Journal of Parasitology**, v.77, n.4, p.592-594, 1991. <https://doi.org/10.2307/3283165>

YOO, E. M.; MORRISON, S. L. IgA: an immune glycoprotein. **Clinical Immunology**, v.116, n.1, p.3-10, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.03.010>

YORI, P. P.; KOSEK, M.; GILMAN, R. H.; CORDOVA, J.; BERN, C.; CHAVEZ, C. B.; OLORTEGUI, M. P.; MONTALVAN, C.; SANCHEZ, G.M.; WORTHEN, J.; LEUNG, F.; ORÉ, C. V. Seroepidemiology of strongyloidiasis in the Peruvian Amazon. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.74, n.1, 97-102, 2006. .

YOSHIDA, H.; ENDO, H.; TANAKA, S.; ISHIKAWA, A.; KONDO, H.; NAKAMURA, T. Recurrent paralytic ileus associated with strongyloidiasis in a patient with systemic lupus erythematosus. **Modern Rheumatology**, v. 16, n.1, p. 44-47, 2006.  
<https://doi.org/10.3109/s10165-005-0447-1>

ZAGO-GOMES, M. P.; AIKAWA, K. F.; PERAZZIO, S. F.; GONÇALVES, C. S.; PEREIRA, F.E. Prevalence of intestinal nematodes in alcoholic patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.6, p. 571-574, 2002.  
<https://doi.org/10.1590/S0037-86822002000600004>

ZHAO, P.; MALEKI, Z. *Strongyloides stercoralis* in bronchoalveolar lavage specimen processed as Prussian Blue stain. **Diagnostic Cytopathology**, v.41, n.2, p.141-143, 2011.  
<https://doi.org/10.1002/dc.21822>

APÊNDICE A  
QUESTIONÁRIO SÓCIODEMOGRÁFICO

Paciente n<sup>o</sup>: \_\_\_\_\_

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

1. Qual sua idade:

\_\_\_\_\_

2. Qual a renda mensal de sua família em salários mínimos (S.M.):

até R\$ 724,00 (1S.M.)

de R\$ 725,00 a R\$ 2.172,00 (acima de 1 até 3 S.M.)

de R\$ 2.173,00 a R\$ 3.620,00 (acima de 3 até 5 S.M.)

acima de R\$ 3.621,00 (acima de 5 S.M.)

\_\_\_\_\_

3. Qual sua escolaridade:

analfabeto

até 4<sup>a</sup> série (fundamental)

5<sup>a</sup> a 8<sup>a</sup> série (fundamental)

1<sup>o</sup> a 3<sup>o</sup> ano (ensino médio)

ensino superior incompleto

ensino superior completo

\_\_\_\_\_

4. Você possui algum tipo de doença:

não

sim, qual: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

5. Você faz uso de alguma medicação:

não

sim, qual: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

6. Com quantos anos começou a ingerir bebidas alcoólicas? \_\_\_\_\_

7. Faz quanto tempo que não ingere bebidas alcoólicas? \_\_\_\_\_

## ANEXO A



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Detecção de anticorpos e imunocomplexos em amostras de soro no diagnóstico da estrogiloidíase em alcoolistas

**Pesquisador:** Luiz Carlos Marques de Oliveira

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 27981914.0.0000.5152

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 840.852

**Data da Relatoria:** 26/09/2014

**Apresentação do Projeto:**

A estrogiloidíase causada pelo nematódeo *Strongyloides stercoralis* é uma parasitose humana negligenciada e uma das infecções parasitárias mais prevalentes em humanos. O consumo de álcool pode afetar o sistema imunitário ao nível da resposta inata ou respostas imunes adquiridas. A associação entre abuso de etanol e infecção pelo *Strongyloides* tem sido relatada na literatura. O alcoolismo crônico pode favorecer a infecção de *S. stercoralis* provavelmente por comprometer o sistema imunológico do hospedeiro, aumentando a sobrevivência do parasito no duodeno e/ou aumentando a eliminação de larvas nas fezes, possibilitando, portanto, maior chance de um exame de fezes positivo e a autoinfecção. A infecção ou sobrevivência do parasito ou eliminação larval aumentada é favorecida mesmo na ausência de cirrose do fígado. A desregulação imune pode ser considerada como o principal fator que favorece a sobrevivência do parasito e a autoinfecção. Diante disso, o estudo da estrogiloidíase torna-se cada vez mais importante devido ao aumento de indivíduos imunossuprimidos na população geral. Desta forma, a detecção precoce previne o desenvolvimento das síndromes clínicas de hiperinfecção e disseminação. O consumo agudo ou crônico de álcool podem afetar o sistema imunitário a nível de resposta inata ou respostas imunes adquiridas, desta forma, a associação entre a exposição ao álcool e o risco de desenvolver uma doença relacionada ao álcool é multifatorial e há uma considerável variação

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 840.852

individual do risco. Assim, a variabilidade de métodos diagnósticos com alta sensibilidade associada a diferentes tipos de amostras biológicas, como fezes, soro e saliva, podem garantir resultados confiáveis e ser úteis para estudos soroepidemiológicos, assim como para o controle, prevenção e tratamento da estrogiloidíase, principalmente em pacientes imunodeprimidos.

#### Metodologia

Será realizado um inquérito soro-epidemiológico com pacientes etilistas atendidos no Centro de Assistência Psicossocial Álcool e outras drogas (CAPS-ad) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e com grupo controle de pacientes não etilistas atendidos no ambulatório de trauma e ortopedia do Hospital das Clínicas da UFU. Após autorização dos responsáveis pelas instituições, será agendada uma reunião no CAPS-ad e no ambulatório de trauma e ortopedia, onde os pacientes serão abordados pela aluna pesquisadora que irá apresentar os objetivos e as etapas da pesquisa. Serão realizadas coletas de amostras pareadas de fezes, sangue e saliva, após a obtenção do TCLE de cada paciente. Todo o material biológico será enviado para o Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), onde serão realizados os exames laboratoriais. O recipientes para coleta de amostras de fezes serão devidamente codificados e disponibilizados para os pacientes, os quais serão orientados a coletar sete amostras de fezes em dias alternados, estas amostras deverão ser deixadas no CAPS-ad ou no ambulatório onde os pacientes estarão em atendimento e serão recolhidas pela pesquisadora. Caso o paciente não compareça ao retorno, as amostras serão recolhidas através de busca ativa pela aluna pesquisadora, pois deverão ser analisadas no máximo em 6 horas após a coleta. Ressaltamos que os pacientes não terão gastos com transporte. Será realizada coleta de uma amostra de sangue por profissional capacitado com material estéril, através de venopunção periférica (5 ml de sangue, para obtermos amostra satisfatória de soro para análise de anticorpos), após será coletado as amostras de saliva. Métodos parasitológicos: Método de Hoffmann, Pons e Janer (1934): 2 gramas de fezes serão colocadas em um "becker" com cerca de 5 ml de água e triturados, será acrescentado 20 ml de água, filtrando a suspensão resultante para um cálice cônico de 200 ml, os resíduos contidos na gaze serão lavados com 20 ml de água, sendo o líquido da lavagem recolhido no mesmo cálice e completado com água para 200 ml. Esta suspensão de fezes permanecerá em repouso durante 24 horas e posteriormente será examinado em microscópio óptico. Método de Cultura em placa de Ágar: 2g de fezes serão semeadas em

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 840.852

placa de ágar que deverão ser tampadas e lacradas com fita adesiva e permanecerão por 2 dias a temperatura de 24 a 33°C. Após este período as placas serão examinadas em lupa e o sedimento deverá ser examinado em microscópio óptico.

#### Coleta das amostras de saliva

As amostras de saliva total serão obtidas a temperatura ambiente com auxílio de um pedaço de algodão limpo. Antes do procedimento, será realizada a higienização da cavidade oral com água, posteriormente será colocado algodão para absorção de saliva. O procedimento será realizado pela aluna pesquisadora, em uma sala disponibilizada pelas instituições co-participantes, após a coleta das amostras de sangue. Um volume de aproximadamente 3mL de saliva por indivíduo será colhido, centrifugadas a 12400 x g a 4°C durante 15 minutos e distribuído em alíquotas, sendo conservados a -20°C. No momento da realização dos testes imunológicos, as amostras de saliva serão descongeladas lentamente. As amostras serão utilizadas para pesquisa de anticorpos das classes IgA e IgG anti-Strongyloides e de imunocomplexo IgG.

#### 4.9 Exames Imunológicos

##### 4.9.1 Teste ELISA IgG e IgA em amostras de soro e de saliva

A reação será realizada conforme Feliciano et al., 2010. Microplacas de poliestireno serão sensibilizadas com extrato salino detergente (D) na concentração de 5 µg/ml em tampão carbonato-bicarbonato (0,06M, pH 9,6) e incubadas overnight a 4°C em volume final de 50 µL por poço. A seguir serão lavadas por três ciclos de cinco minutos com PBS contendo 0,05% tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T acrescido de 3% de leite desnatado por 45 minutos a 37°C. Posteriormente, as amostras de soro serão diluídas a 1:100 em PBS-T para detecção de IgG e 1:20 para detecção de IgA; as amostras de saliva serão diluídas a 1:2 em PBS-T para detecção de IgG e IgA. As amostras serão incubadas por 45 minutos a 37°C. Após a lavagem, os conjugados anti-IgG e anti-IgA humana marcado com peroxidase serão adicionados, na diluição ideal. A reação será revelada pela adição do substrato peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e do cromógeno orto-fenilenodiamina (OPD) por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação será interrompida adicionando-se 25 µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N). A densidade ótica (DO) será determinada em leitor de ELISA em comprimento de onda de 492 nm. Os resultados serão expressos como índice ELISA (IE), de acordo com a fórmula: IE = DO amostra/cut off, onde cut off será estabelecido como a média de DO de 15 controles negativos de amostras de soro ou saliva

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 840.852

acrescidas de dois desvios padrões. Estas amostras serão obtidas de indivíduos sadios para testes parasitológicos e pesquisa de IgG e IgA anti-Strongyloides negativos. As amostras serão consideradas positivas quando  $IE > 1$ .

**4.9.3 Teste ELISA para detecção de imunocomplexos IgG circulantes em amostras de soro e de saliva**  
Placas de microtitulação serão sensibilizadas com 50  $\mu$ L/poço de IgG anti-larva de *S. venezuelensis* na concentração de 40  $\mu$ g/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6 por 18 horas a 4°C. Após incubação as placas serão lavadas 3 vezes em PBS-T por 5 minutos cada lavagem. A seguir serão adicionados 50  $\mu$ L/poço de soro, no título ideal. As amostras de saliva serão utilizadas sem diluição. Amostras de soro e saliva positivas e negativas para IgG anti - *S. venezuelensis* serão utilizadas como amostras de referência. As placas serão incubadas por 45 minutos a 37°C, lavadas como descrito anteriormente e incubadas com 50  $\mu$ L/poço do conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase, no título ideal.. Após incubar por 45 minutos a 37°C, as placas serão lavadas 3 vezes em PBS-T por 5 minutos reveladas pelo substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e cromógeno o-fenilenodiamina. O cut-off será calculado como a média da DOU- dos 15 controles negativos, acrescido de dois desvios padrão, para cada diluição (BASSI et al., 1991). A reatividade dos soros será expressa em índice IE a as amostras serão consideradas positivas quanto  $IE > 1$ .

**Critério de Inclusão:**

Para compor o estudo serão utilizados os seguintes critérios de inclusão: pacientes com diagnóstico de alcoolismo, de acordo com os resultados obtidos nos questionários de rastreamento de abuso de álcool cut-down, annoyed by criticism, guilty, eye-opener - CAGE (EWING, 1984) e Alcohol Use Disorder Identifications Test - AUDIT (BABOR et al., 2001), que realizam acompanhamento no CAPS-ad; maiores de 18 anos; sexo masculino, e que concordarem em participar deste estudo através da assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Estes questionários de rastreamento também serão utilizados para afastar abuso de álcool entre os pacientes do grupo controle

**Critério de Exclusão:**

Não serão incluídos pacientes que se recusarem a participar do estudo; pacientes com qualquer alteração mental que prejudique sua tomada de decisão, pacientes com doença crônica debilitante e aqueles em uso de medicamentos imunossupressores.

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br





Continuação do Parecer: 840.852

**Objetivo da Pesquisa:**

**OBJETIVOS**

- Realizar o diagnóstico parasitológico em amostras de fezes em grupo de pacientes etilistas e grupo de pacientes não-etilistas.
- Realizar a detecção de anticorpos e imunocomplexos circulantes em amostras de soro e de saliva em grupo de pacientes etilistas e grupo de pacientes não-etilistas.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo os pesquisadores

**Riscos:**

A pesquisa apenas será iniciada após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Este trabalho oferece risco físico mínimo aos sujeitos da pesquisa, uma vez que, a punção venosa para coleta de amostra de sangue pode causar dor no local, hematoma, ou desconforto, como tontura. Se ocorrer alguma situação que necessite de cuidados, o paciente será encaminhado, imediatamente para atendimento médico especializado. Cabe ressaltar que a coleta da amostra de sangue será realizada por profissional capacitado, em veia periférica com material esterilizado e descartável observando os princípios técnicos de assepsia, minimizando os riscos físicos. A entrevista não oferece danos e a equipe executora se compromete com o sigilo absoluto sobre a identidade do sujeito da pesquisa.

**Benefícios:**

Os resultados deste trabalho poderão beneficiar os sujeitos da pesquisa direta e indiretamente, uma vez que, espera-se que o uso de novos métodos diagnósticos associado a diferentes tipos de amostras biológicas possam ser úteis para o diagnóstico da estrogiloidíase e para o seu controle, prevenção e tratamento em pacientes imunodeprimidos, uma vez que, quando a estrogiloidíase não é devidamente tratada pode ocorrer o processo de disseminação ou hiperinfecção

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa apresenta relevância científica.

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 840.852

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

Os pesquisadores apresentaram os termos obrigatórios de forma adequada.

**Recomendações:**

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

Os pesquisadores apresentaram as devidas justificativas do parecer 775.682, datado em 02 de setembro de 2014.

A emenda foi aprovada.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação da emenda ao protocolo de pesquisa proposto.

A emenda ao protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: novembro de 2016

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 840.852

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12 ) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

UBERLÂNDIA, 22 de Outubro de 2014

---

**Assinado por:**  
**Sandra Terezinha de Farias Furtado**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

## ANEXO B



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Detecção de anticorpos e imunocomplexos em amostras de soro e de saliva no diagnóstico da estrogiloidíase em alcoolistas

**Pesquisador:** Luiz Carlos Marques de Oliveira

**Área Temática:**

**Versão:** 5

**CAAE:** 27981914.0.0000.5152

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 974.357

**Data da Relatoria:** 15/01/2015

**Apresentação do Projeto:**

Conforme apresenta a emenda: A estrogiloidíase causada pelo nematódeo *Strongyloides stercoralis* é uma parasitose humana negligenciada e uma das infecções parasitárias mais prevalentes em humanos. O consumo de álcool pode afetar o sistema imunitário ao nível da resposta inata ou respostas imunes adquiridas. A associação entre abuso de etanol e infecção pelo *Strongyloides* tem sido relatada na literatura. O alcoolismo crônico pode favorecer a infecção de *S.stercoralis* provavelmente por comprometer o sistema imunológico do hospedeiro, aumentando a sobrevivência do parasito no duodeno e/ou aumentando a eliminação de larvas nas fezes, possibilitando, portanto, maior chance de um exame de fezes positivo e a autoinfecção. A infecção ou sobrevivência do parasito ou eliminação larval aumentada é favorecida mesmo na ausência de cirrose do fígado. A desregulação imune pode ser considerada como o principal fator que favorece a sobrevivência do parasito e a autoinfecção. Diante disso, o estudo da estrogiloidíase torna-se cada vez mais importante devido ao aumento de indivíduos imunossuprimidos na população geral. Desta forma, a detecção precoce previne o desenvolvimento das síndromes clínicas de hiperinfecção e disseminação. O consumo agudo ou crônico de álcool podem afetar o sistema imunitário a nível de resposta inata ou respostas imunes adquiridas, desta forma, a associação entre a exposição ao álcool e o risco de desenvolver uma doença relacionada ao álcool é

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 974.357

multifatorial e há uma considerável variação individual do risco. Assim, a variabilidade de métodos diagnósticos com alta sensibilidade associada a diferentes tipos de amostras biológicas, como fezes, soro e saliva, podem garantir resultados confiáveis e ser úteis para estudos soroepidemiológicos, assim como para o controle, prevenção e tratamento da estrogiloidíase, principalmente em pacientes imunodeprimidos.

**Metodologia:** Serão realizadas coletas de amostras pareadas de fezes, sangue e saliva, após a obtenção do TCLE de cada paciente. Todo o material biológico será enviado para o Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), onde serão realizados os exames laboratoriais. O recipientes para coleta de amostras de fezes serão devidamente codificados e disponibilizados para os pacientes, os quais serão orientados a coletar sete amostras de fezes em dias alternados, estas amostras deverão ser deixadas no CAPS-ad ou no ambulatório onde os pacientes estarão em atendimento e serão recolhidas pela pesquisadora. Caso o paciente não compareça ao retorno, as amostras serão recolhidas através de busca ativa pela aluna pesquisadora, pois deverão ser analisadas no máximo em 6 horas após a coleta. Ressaltamos que os pacientes não terão gastos com transporte. Será realizada coleta de uma amostra de sangue por profissional capacitado com material estéril, através de venopunção periférica (5 ml de sangue, para obtermos amostra satisfatória de soro para análise de anticorpos), após será coletado as amostras de saliva. **Métodos parasitológicos:** Método de Hoffmann, Pons e Janer (1934): 2 gramas de fezes serão colocadas em um "becker" com cerca de 5 ml de água e triturados, será acrescentado 20 ml de água, filtrando a suspensão resultante para um cálice cônico de 200 ml, os resíduos contidos na gaze serão lavados com 20 ml de água, sendo o líquido da lavagem recolhido no mesmo cálice e completado com água para 200 ml. Esta suspensão de fezes permanecerá em repouso durante 24 horas e posteriormente será examinado em microscópio óptico. Método de Cultura em placa de Ágar: 2g de fezes serão semeadas em placa de ágar que deverão ser tampadas e lacradas com fita adesiva e permanecerão por 2 dias a temperatura de 24 a 33°C. Após este período as placas serão examinadas em lupa e o sedimento deverá ser examinado em microscópio óptico.

**Coleta das amostras de saliva** As amostras de saliva total serão obtidas a temperatura ambiente com auxílio de um pedaço de algodão limpo. Antes do procedimento, será realizada a higienização da cavidade oral com água, posteriormente será colocado algodão para absorção de saliva. O procedimento será realizado pela aluna pesquisadora, em uma sala disponibilizada pelas instituições co-participantes, após a coleta das amostras de sangue. Um volume de

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 974.357

aproximadamente 3mL de saliva por indivíduo será colhido, centrifugadas a 12400 x g a 4°C durante 15 minutos e distribuído em alíquotas, sendo conservados a -20°C. No momento da realização dos testes imunológicos, as amostras de saliva serão descongeladas lentamente. As amostras serão utilizadas para pesquisa de anticorpos das classes IgA e IgG anti-Strongyloides e de imunocomplexo IgG.

#### Exames Imunológicos

Teste ELISA IgG e IgA em amostras de soro e de saliva A reação será realizada conforme Feliciano et al., 2010. Microplacas de poliestireno serão sensibilizadas com extrato salino detergente (D) na concentração de 5 µg/ml em tampão carbonato-bicarbonato (0,06M, pH 9,6) e incubadas overnight a 4°C em volume final de 50 µL por poço. A seguir serão lavadas por três ciclos de cinco minutos com PBS contendo 0,05% tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T acrescido de 3% de leite desnatado por 45 minutos a 37°C. Posteriormente, as amostras de soro serão diluídas a 1:100 em PBS-T para detecção de IgG e 1:20 para detecção de IgA; as amostras de saliva serão diluídas a 1:2 em PBS-T para detecção de IgG e IgA. As amostras serão incubadas por 45 minutos a 37°C. Após a lavagem, os conjugados anti-IgG e anti-IgA humana marcado com peroxidase serão adicionados, na diluição ideal. A reação será revelada pela adição do substrato peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e do cromógeno ortofenilenodiamina (OPD) por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação será interrompida adicionando-se 25 µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N). A densidade ótica (DO) será determinada em leitor de ELISA em comprimento de onda de 492 nm. Os resultados serão expressos como índice ELISA (IE), de acordo com a fórmula:  $IE = DO \text{ amostra} / \text{cut off}$ , onde cut off será estabelecido como a média de DO de 15 controles negativos de amostras de soro ou saliva acrescidas de dois desvios padrões. Estas amostras serão obtidas de indivíduos sadios para testes parasitológicos e pesquisa de IgG e IgA anti-Strongyloides negativos. As amostras serão consideradas positivas quando  $IE > 1$ .

Teste ELISA para detecção de imunocomplexos IgG circulantes em amostras de soro e de saliva Placas de microtitulação serão sensibilizadas com 50 µL/poço de IgG anti-larva de *S. venezuelensis* na concentração de 40 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6 por 18 horas a 4°C. Após incubação as placas serão lavadas 3 vezes em PBS-T por 5 minutos cada lavagem. A seguir serão adicionados 50 µL/poço de soro, no título ideal. As amostras de saliva serão utilizadas sem diluição. Amostras de soro e saliva positivas e negativas para IgG anti – *S. venezuelensis* serão utilizadas como amostras de referência. As placas serão incubadas por 45

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 974.357

minutos a 37°C, lavadas como descrito anteriormente e incubadas com 50 µL/poço do conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase, no título ideal.. Após incubar por 45 minutos a 37°C, as placas serão lavadas 3 vezes em PBS-T por 5 minutos reveladas pelo substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e cromógeno o-fenilenodiamina. O cut-off será calculado como a média da DOu- dos 15 controles negativos, acrescido de dois desvios padrão, para cada diluição (BASSI et al., 1991). A reatividade dos soros será expressa em índice IE a as amostras serão consideradas positivas quanto IE >1.

**Critério de Inclusão:** Para compor o estudo serão utilizados os seguintes critérios de inclusão: pacientes com diagnóstico de alcoolismo, de acordo com os resultados obtidos nos questionários de rastreamento de abuso de álcool cutdown, annoyed by criticism, guilty, eye-opener - CAGE (EWING, 1984) e Alcohol Use Disorder Identifications Test - AUDIT (BABOR et al., 2001), que realizam acompanhamento no CAPS-ad; maiores de 18 anos; sexo masculino, e que concordarem em participar deste estudo através da assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Estes questionários de rastreamento também serão utilizados para afastar abuso de álcool entre os pacientes do grupo controle **Critério de Exclusão:** Não serão incluídos pacientes que se recusarem a participar do estudo; pacientes com qualquer alteração mental que prejudique sua tomada de decisão, pacientes com doença crônica debilitante e aqueles em uso de medicamentos imunossupressores.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

##### **OBJETIVOS:**

- Realizar o diagnóstico parasitológico em amostras de fezes em grupo de pacientes etilistas e grupo de pacientes não-etilistas.
- Realizar a detecção de anticorpos e imunocomplexos circulantes em amostras de soro e de saliva em grupo de pacientes etilistas e grupo de pacientes não-etilistas.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo os pesquisadores

Riscos: A pesquisa apenas será iniciada após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Este trabalho oferece risco físico mínimo aos sujeitos da pesquisa, uma vez que, a punção venosa para coleta de amostra de sangue pode

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 974.357

causar dor no local, hematoma, ou desconforto, como tontura. Se ocorrer alguma situação que necessite de cuidados, o paciente será encaminhado, imediatamente para atendimento médico especializado. Cabe ressaltar que a coleta da amostra de sangue será realizada por profissional capacitado, em veia periférica com material esterilizado e descartável observando os princípios técnicos de assepsia, minimizando os riscos físicos.

A entrevista não oferece danos e a equipe executora se compromete com o sigilo absoluto sobre a identidade do sujeito da pesquisa.

**Benefícios:** Os resultados deste trabalho poderão beneficiar os sujeitos da pesquisa direta e indiretamente, uma vez que, espera-se que o uso de novos métodos diagnósticos associado a diferentes tipos de amostras biológicas possam ser úteis para o diagnóstico da estrogiloidíase e para o seu controle, prevenção e tratamento em pacientes imunodeprimidos, uma vez que, quando a estrogiloidíase não é devidamente tratada pode ocorrer o processo de disseminação ou hiperinfecção.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa apresenta relevância científica.

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

Os pesquisadores apresentaram uma emenda justificando a participação de voluntários oriundos de outro centro de atendimento, conforme descrito no texto abaixo:

"Devido ao número de pacientes menor que a amostra mínima necessária, que aceitaram participar da pesquisa no ambulatório de trauma e ortopedia e CAPS-ad - UFU, e visando atingir o número previsto de pacientes para compor a amostra do estudo, solicitamos aprovação para inserir no projeto acima citado grupo de pacientes etilistas atendidos no CAPS-ad da Secretaria Municipal de Saúde de Uberlândia e não etilistas atendidos na Unidade de Atenção Primária à Saúde – UAPS Custódio Pereira; UAPS Dona Zulmira; Unidade de Atenção Primária a Saúde da Família- UAPSF Ipanema; UAPSF Mansour– Uberlândia/MG. Ressaltamos que haverá apenas alteração no item referente à caracterização da amostra, no qual será acrescentado pacientes do CAPS-ad da Secretaria Municipal de Saúde de Uberlândia e pacientes das UAPS e UAPSF."

**Recomendações:**

Não há.

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br





Continuação do Parecer: 974.357

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

As pendências apontadas no parecer 840.852 foram atendidas.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação da emenda do protocolo de pesquisa proposto.

A emenda do protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12 ) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 974.357

aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

UBERLÂNDIA, 05 de Março de 2015

---

**Assinado por:**  
**Sandra Terezinha de Farias Furtado**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

## ANEXO C

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa intitulada DETECÇÃO DE ANTICORPOS E IMUNOCOMPLEXOS EM AMOSTRAS DE SORO E DE SALIVA NO DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE EM ALCCOLISTAS, sob a responsabilidade dos pesquisadores Prof. Dr. Luiz Carlos Marques de Oliveira; Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Julia Maria Costa-Cruz; Dr<sup>a</sup> Ana Lucia Ribeiro Gonçalves; Marcelo Arantes Levenhagen; Alana Arantes Santos Gonçalves. Nesta pesquisa nós estamos buscando realizar o diagnóstico parasitológico em amostras de fezes em grupo de pacientes etilistas e grupo de pacientes não-etilistas, como também, realizar a detecção de anticorpos e imunocomplexos circulantes em amostras de soro e de saliva destes mesmos pacientes.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pela aluna pesquisadora Alana Arantes Santos Gonçalves no Centro de Assistência Psicossocial Álcool e outras Drogas (CAPS-ad); no ambulatório de trauma e ortopedia da UFU; na UAPS e UAPSF. Na sua participação o senhor será submetido à coleta de exames laboratoriais de fezes, sangue e saliva, como também, responderá a três questionários. Os recipientes para coleta de amostras de fezes serão entregue ao senhor que deverá coletar sete amostras de fezes dia sim e dia não, estas amostras deverão ser armazenadas nestes recipientes e, posteriormente, as amostras deverão ser deixadas no CAPS-ad, no ambulatório, na UAPS ou na UAPSF onde o senhor estará em atendimento e serão recolhidas pela pesquisadora. Caso o senhor não compareça ao retorno, as amostras serão recolhidas através de busca ativa pela aluna pesquisadora, pois deverão ser analisadas no máximo em 6 horas após a coleta. Ressaltamos que o senhor não terá gastos com transporte.

A amostra de sangue será coletada por profissional capacitado, na sala disponibilizada para coleta no CAPS-ad, pelo ambulatório de trauma e ortopedia da UFU, pela UAPS e pela UAPSF, com material estéril e descartável através de venopunção periférica (5ml de sangue, para obtermos amostra satisfatória de soro para análise dos exames), observando os princípios técnicos de assepsia, minimizando os riscos físicos. Depois da coleta de amostras de sangue, será realizada a coleta de amostras de saliva pela aluna pesquisadora que colocará pequenos pedaços de algodão na cavidade oral para absorção de saliva e rapidamente serão retirados. Todo o material será encaminhado para o Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Em nenhum momento o senhor será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar da pesquisa. Este trabalho oferece risco físico mínimo ao senhor, pois, a punção venosa para coleta de amostra de sangue pode causar dor no local, hematoma, ou desconforto, como tontura. Se ocorrer alguma situação que necessite de cuidados, o senhor será encaminhado, imediatamente para atendimento médico especializado. A entrevista não oferece danos e a equipe executora se compromete com o sigilo absoluto sobre a identidade do sujeito da pesquisa.

Os resultados desta pesquisa poderão beneficiar os sujeitos da pesquisa direta e indiretamente, uma vez que, espera-se que o uso de novos métodos diagnósticos associado a diferentes tipos de amostras biológicas possam ser úteis para o controle, prevenção e tratamento da estrogiloidíase em pacientes imunodeprimidos, uma vez que, quando a estrogiloidíase não é devidamente tratada pode ocorrer o processo de disseminação ou hiperinfecção. Lembrando que após a análise dos exames laboratoriais será comunicado ao senhor o resultado de seu exame e aqueles com resultados positivos serão devidamente tratados, sem nenhum custo para o paciente.

Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.

Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com Prof. Dr. Luiz Carlos Marques de Oliveira (orientador da pesquisa) - Av: Para, 1720, Bloco 2H, Campus Umuarama – Uberlândia MG – 3218-2246 ou Alana Arantes Santos Gonçalves (aluna pesquisadora) – Av: Para, 1720, Bloco 2H, Campus Umuarama – Uberlândia MG – 3218-2389.

Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na pesquisa com seres humanos – Universidade federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia – MG, CEP:38408-100; fone: 34-3239-4131.

Uberlândia, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

---

Prof. Dr. Luiz Carlos Marques de Oliveira

---

Alana Arantes Santos Gonçalves

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

---


Participante da pesquisa

## ANEXO D

## DECLARAÇÃO DA INSTITUIÇÃO CO-PARTICIPANTE

Declaro estar ciente que o Projeto de Pesquisa "DETECÇÃO DE ANTICORPOS E IMUNOCOMPLEXOS EM AMOSTRAS DE SORO NO DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE EM ALCCOLISTAS," será avaliado por um Comitê de Ética em Pesquisa e concordar com o parecer ético emitido por este CEP, conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 196/96. Esta Instituição está ciente de suas co-responsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infraestrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

Autorizo os pesquisadores Prof. Dr. Luiz Carlos Marques de Oliveira; Profª Drª Julia Maria Costa-Cruz; Drª Ana Lucia Ribeiro Gonçalves; Marcelo Arantes Levenhagen; Alana Arantes Santos Gonçalves realizarem a etapa de abordagem dos pacientes que irão participar da pesquisa e esclarecimento dos objetivos e das etapas da pesquisa utilizando-se da infra-estrutura desta Instituição.

  
 Sra. Maria Abadia Guerra  
 Coordenadora  
 Centro de Assistência Psicossocial Álcool e outras drogas

*Maria Abadia Guerra  
 Coord. CAPS-AD/UFU*

Uberlândia, 06 / 02 / 2014.

## ANEXO E

**DECLARAÇÃO DA INSTITUIÇÃO CO-PARTICIPANTE**

Declaro estar ciente que o Projeto de Pesquisa "DETECÇÃO DE ANTICORPOS E IMUNOCOMPLEXOS EM AMOSTRAS DE SORO NO DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE EM ALCCOLISTAS," será avaliado por um Comitê de Ética em Pesquisa e concordar com o parecer ético emitido por este CEP, conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 196/96. Esta Instituição está ciente de suas co-responsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

Autorizo os pesquisadores Prof. Dr. Luiz Carlos Marques de Oliveira; Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Julia Maria Costa-Cruz; Dr<sup>a</sup> Ana Lucia Ribeiro Gonçalves; Marcelo Arantes Levenhagen; Alana Arantes Santos Gonçalves realizarem a etapa de abordagem dos pacientes que irão participar da pesquisa e esclarecimento dos objetivos e das etapas da pesquisa utilizando-se da infra-estrutura desta Instituição.

Hospital de Clínicas de Uberlândia  
 Prof. Orlando César Mantese  
 Diretor de Ensino e Pesquisa  
 CRM-MG 33247 / CPE 913.091.368-04

Prof. Dr. Orlando Cesar Mantese  
 Diretor de Ensino e Pesquisa  
 Hospital de Clinicas de Uberlândia/UFU

Uberlândia, 06 / 02 / 2014 .

## ANEXO F

## DECLARAÇÃO DA INSTITUIÇÃO CO-PARTICIPANTE

Declaro estar ciente que o Projeto de Pesquisa “DETECÇÃO DE ANTICORPOS E IMUNOCOMPLEXOS EM AMOSTRAS DE SORO NO DIAGNÓSTICO DA ESTRONGILOIDÍASE EM ALCCOLISTAS,” será avaliado por um Comitê de Ética em Pesquisa e concordar com o parecer ético emitido por este CEP, conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 196/96. Esta Instituição está ciente de suas co-responsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

Autorizo os pesquisadores Prof. Dr. Luiz Carlos Marques de Oliveira; Profª Drª Julia Maria Costa-Cruz; Drª Ana Lucia Ribeiro Gonçalves; Marcelo Arantes Levenhagen; Alana Arantes Santos Gonçalves realizarem a etapa de análise dos exames laboratoriais utilizando-se da infra-estrutura desta Instituição.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Prof. Dr. Roberto Bernardino Júnior

Prof. Dr. Roberto Bernardino Junior

Portaria R Nº 735/2013

Diretor

Instituto de Ciências Biomédicas – UFU

Uberlândia, 06/02/2014.

## ANEXO G

DIRETORIA DE  
**GESTÃO DE PESSOAS**  
E EDUCAÇÃO EM SAÚDE

SECRETARIA MUNICIPAL DE  
**SAÚDE**

PREFEITURA DE  
**UBERLÂNDIA**  
POR UMA CIDADE EDUCADORA

**DECLARAÇÃO DA INSTITUIÇÃO CO-PARTICIPANTE**

Declaro estar ciente que o Projeto de Pesquisa "**Deteção de anticorpos e imunocomplexos em amostras de soro e de saliva no diagnóstico da estrogiloidiase em alcoolistas**" será avaliado por um Comitê de Ética em Pesquisa e concordar com o parecer ético emitido por este CEP, conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Esta Instituição está ciente de suas co-responsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

Autorizo os pesquisadores Prof. **Dr. Luiz Carlos Marques de Oliveira; Profa Dra Julia Maria Costa-Cruz; Dra Ana Lucia Ribeiro Gonçalves; Marcelo Arantes Levenhagen; Alana Arantes Santos Gonçalves** realizarem as etapas de: abordagem dos pacientes que irão participar da pesquisa; esclarecimento dos objetivos e das etapas da pesquisa; coleta das amostras para a pesquisa utilizando-se da infra-estrutura desta Instituição.



**Maria Tereza Perez**

Coordenadora do Programa de Ações em Saúde Mental  
Secretaria Municipal de Saúde de Uberlândia - MG

**Maria Tereza Perez**  
Psicóloga  
CPF: 2.073.441-4  
Secretaria Municipal  
de Saúde - MG

Uberlândia, 21/11/2014



## ANEXO H

DIRETORIA DE  
**GESTÃO DE PESSOAS**  
E EDUCAÇÃO EM SAÚDE

SECRETARIA MUNICIPAL DE  
**SAÚDE**

PREFEITURA DE  
**UBERLÂNDIA**  
POR UMA CIDADE EDUCADORA

## DECLARAÇÃO DA INSTITUIÇÃO CO-PARTICIPANTE

Declaro estar ciente que o Projeto de Pesquisa "**Deteção de anticorpos e imunocomplexos em amostras de soro e de saliva no diagnóstico da estrogiloidíase em alcoolistas**" será avaliado por um Comitê de Ética em Pesquisa e concordar com o parecer ético emitido por este CEP, conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 466/12. Esta Instituição está ciente de suas co-responsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

Autorizo os pesquisadores Prof. **Dr. Luiz Carlos Marques de Oliveira; Profa Dra Julia Maria Costa-Cruz; Dra Ana Lucia Ribeiro Gonçalves; Marcelo Arantes Levenhagen; Alana Arantes Santos Gonçalves** realizarem as etapas de: abordagem dos pacientes que irão participar da pesquisa; esclarecimento dos objetivos e das etapas da pesquisa; coleta das amostras para a pesquisa utilizando-se da infra-estrutura desta Instituição.

*Elisa Toffoli Rodrigues*  
Elisa Toffoli Rodrigues  
Coordenadora da Atenção Primária à Saúde  
Secretaria Municipal de Saúde de Uberlândia - MG

Uberlândia, 15/12/14.

## ANEXO I

## QUESTIONÁRIO CAGE ( cut down, annoyed by criticism, guilty, eye-opener)

1- Alguma vez o (a) senhor(a) sentiu que deveria diminuir a quantidade de bebida alcoólica ou de parar de beber?

Sim  Não

1- As pessoas o (a) aborrecem porque criticam o seu modo de tomar bebida alcoólica?

Sim  Não

3- O (A) senhor(a) se sente chateado(a) consigo(a) mesmo(a) pela maneira como costuma tomar bebida alcoólica?

Sim  Não

4- Costuma tomar bebidas alcoólicas pela manhã para diminuir o nervosismo ou ressaca?

Sim  Não

## ANEXO J

## QUESTIONÁRIO AUDIT (Alcohol Use Disorder Identifications Test)

Nas questões abaixo, marque com um “X” abaixo de sua resposta

Obs: 1 dose= 150 ml de vinho; 350 ml de cerveja (1 lata); 40 ml de destilados (wisky, vodka, pinga)

2- Com que frequência você consome bebidas alcoólicas?

- (0) Nunca (Ir para as questões 9-10)
- (1) Uma vez por mês ou menos
- (2) 2 a 4 vezes por mês
- (3) 2 a 3 vezes por semana
- (4) 4 ou mais vezes por semana

2- Quantas doses de álcool você consome num dia normal?

- (0) 0 ou 1
- (1) 2 ou 3
- (2) 4 ou 5
- (3) 6 ou 7
- (4) 8 ou mais

3- Com que frequência você consome cinco ou mais doses em uma única ocasião?

- (0) Nunca
- (1) Menos que uma vez por mês
- (2) Uma vez por mês
- (3) Uma vez por semana
- (4) Quase todos os dias

Passar às perguntas 9 e 10 se a pontuação total para as perguntas 2 e 3 for igual a zero.

4- Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você achou que não conseguiria parar de beber uma vez tendo começado?

- (0) Nunca
- (1) Menos que uma vez por mês
- (2) Uma vez por mês
- (3) Uma vez por semana
- (4) Quase todos os dias

5- Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você não conseguiu fazer o que era esperado de você por causa do álcool?

- (0) Nunca
- (1) Menos que uma vez por mês
- (2) Uma vez por mês
- (3) Uma vez por semana
- (4) Quase todos os dias

6- Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você precisou beber pela manhã para poder se sentir bem ao longo do dia após ter bebido bastante no dia anterior?

- (0) Nunca
- (1) Menos que uma vez por mês
- (2) Uma vez por mês
- (3) Uma vez por semana
- (4) Quase todos os dias

7- Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você se sentiu culpado ou com remorso após ter bebido?

- (0) Nunca
- (1) Menos que uma vez por mês
- (2) Uma vez por mês
- (3) Uma vez por semana
- (4) Quase todos os dias

8- Quantas vezes ao longo dos últimos doze meses você foi incapaz de lembrar o que aconteceu devido à bebida?

- (0) Nunca
- (1) Menos que uma vez por mês
- (2) Uma vez por mês
- (3) Uma vez por semana
- (4) Quase todos os dias

9- Você já causou ferimentos ou prejuízos a você mesmo ou a outra pessoa após ter bebido?

- (0) Não
- (2) Sim, mas não no último ano
- (4) Sim, durante o último ano

10- Alguém ou algum parente, amigo ou médico já se preocupou com o fato de você beber ou sugeriu que você parasse?

- (0) Não
- (2) Sim, mas não no último ano
- (4) Sim, durante o último ano