

Métodos diagnósticos em parasitologia: conceitos e aplicações

Giuseppe Palmisano, Ph.D.
Departamento de Parasitologia, ICB USP

Agenda:

Conceitos fundamentais sobre a avaliação dos métodos diagnósticos

Conceitos teóricos sobre os métodos diagnósticos

Aplicações de métodos estabelecidos e inovadores na detecção de parasitas

Parasitas do sangue:

Parasitas intestinais:

A **Parasitologia Clínica** estuda os organismos que **parasitam o homem**. Os organismos referidos como **parasitos** são um **grupo heterogêneo** que varia em tamanho, desde os pequenos microsporídios até os complexos organismos multicelulares, como a *Taenia saginata*.

G. Attilio de Carli

Introduction

- **Clinical parasitology**: study of important parasites which cause disease to human (classification, symptoms, disease, lifecycle, transmission, treatment).
- **Microbiology**= Virology, Bacteriology, Mycology and **Parasitology**
- **Medical parasitology** traditionally has included the study of three major groups of animals: parasitic **protozoa**, parasitic **helminths** (worms), and those **arthropods** that directly cause disease or act as vectors of various pathogens.
- **More than 50,000** species have been described, most of which are free-living organisms.

Introduction

A **parasite** is a pathogen that simultaneously injures and derives sustenance from its host. Some parasites are actually commensals, in that they neither benefit nor harm their host (*Entamoeba coli*).

Parasites are organisms that obtain food and shelter by living on or within another organism.

The **parasite** derives all benefits from association and the host may either not be harmed or may suffer the consequences of this association.

Parasites are **eukaryotic unicellular OR multicellular**.

Don't have **cell wall**.

Clinical significance of parasites

Infections of humans caused by parasites number in the billions and range from relatively harmless to fatal.

The diseases caused by these parasites constitute major human health problems throughout the world. (For example, approximately 30% of the world's population is infected with *Ascaris lumbricoides*.)

The incidence of many parasitic diseases (e.g., malaria) have increased rather than decreased in recent years.

Other parasitic illnesses have increased in importance as a result of the AIDS epidemic.

The migration of parasite-infected people, including refugees, from areas with high prevalence rates of parasitic infection also has added to the

Morphology

The unicellular parasites are (protozoa) and multicellular parasites are (helminths, arthropods)

Most parasitic protozoa in humans are less than 50 μm in size. The smallest (mainly intracellular forms) are 1 to 10 μm long, but *Balantidium coli* may measure 150 μm .

Terminology

The parasite is termed **obligate** when it can live only in association with a host or it is classified as **facultative** when it can live in or on a host as well as in a free form.

Parasites which live inside the body are termed **endoparasites** whereas those which exist on the body surface are called **ectoparasites**.

Parasites that cause harm to the host are **pathogenic** parasites while those that benefit from the host without causing it any harm are known as **commensals**.

Terminology

The organism that harbors the parasite and suffers a loss caused by the parasite is a **host**.

The host in which the parasite lives its adult and sexual stage is the **definitive host** whereas the host in which a parasite lives as the larval and asexual stage is the **intermediate host**.

Other hosts that harbor the parasite and thus ensure continuity of the parasite's life cycle and act as additional sources of human infection are known as **reservoir hosts**.

An organism (usually an insect) that is responsible for transmitting the parasitic infection is known as the **vector**.

Classification

Parasites:

Protozoa

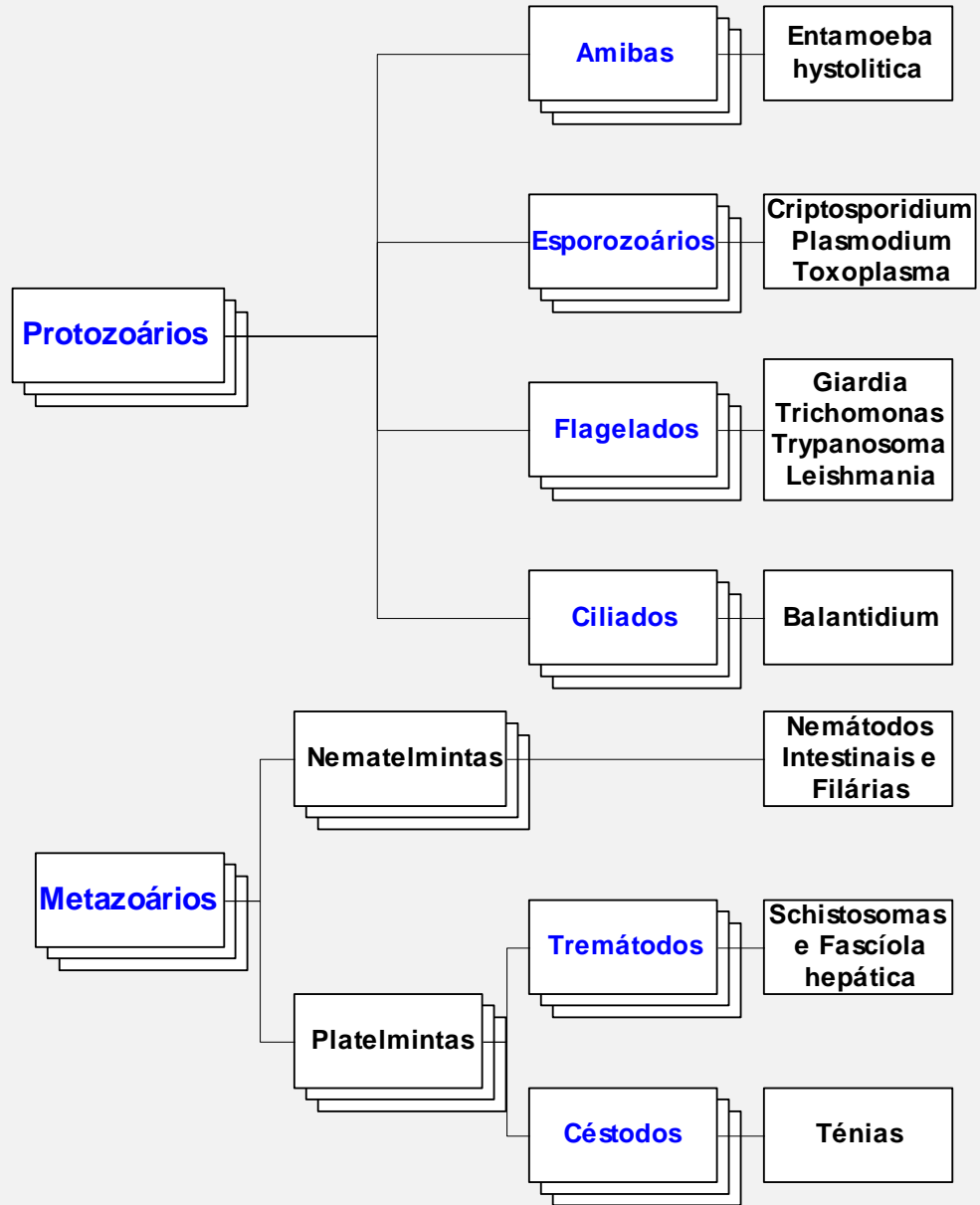
Helminths

Arthropods

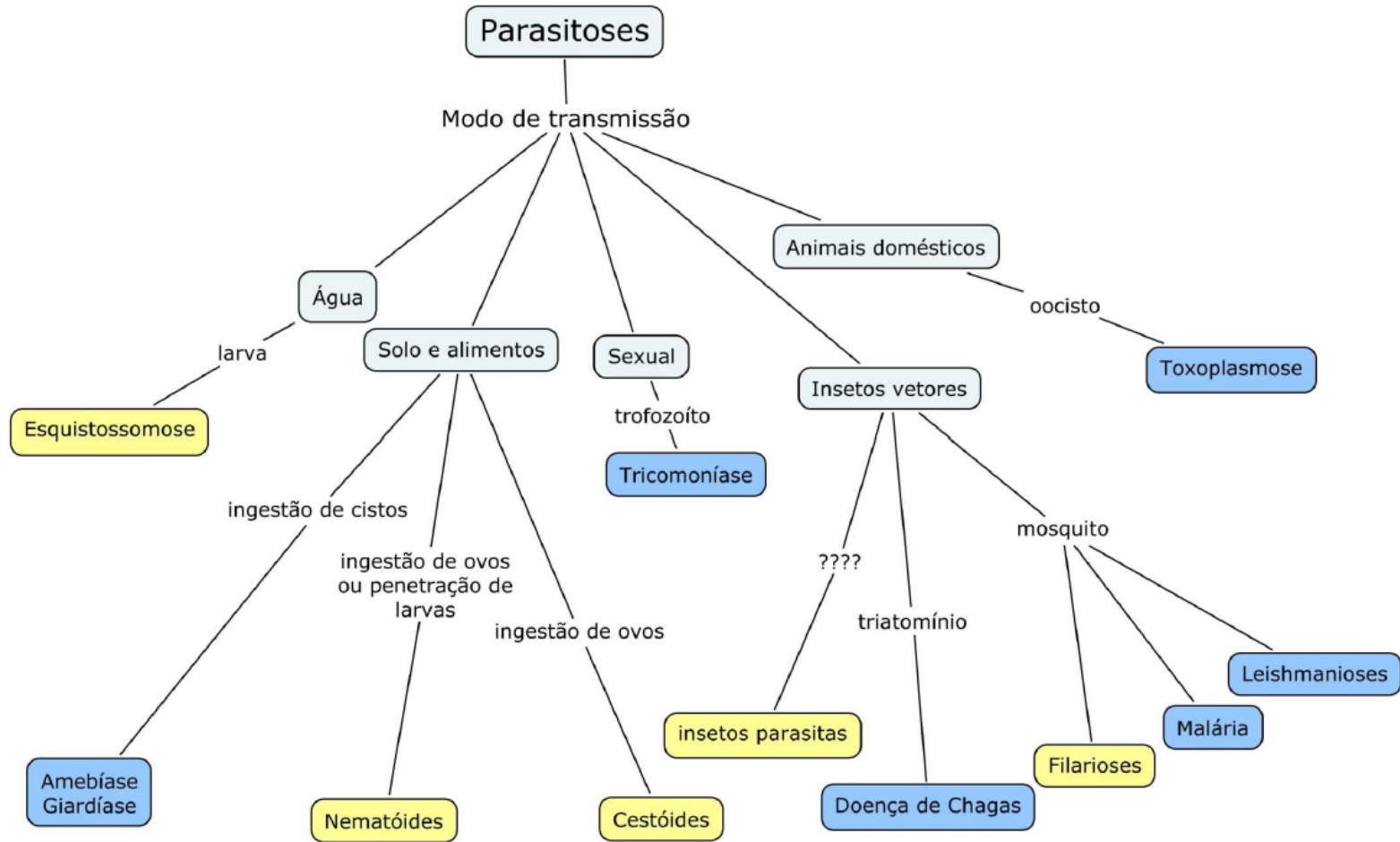
Protozoa are unicellular parasites.

1. **Sarcodina**: motile by false feet ex. *Entamebea histolitca*
2. **Mastigophora**: motile by flagella ex. *Giardia lambelia*
3. **Ciliophora** : motile by cilia ex. *Balantidium coli*
4. **Sporozoa**: non motile ex *plasmodium* and *toxoplasma gondii*

Parasitas



Modos de transmissão



The importance of highly confident diagnostic tests

- The use of diagnostic tests is a crucial aspect of clinical practice since they assist clinicians in establishing whether a patient has or does not have a particular condition;
- Correct diagnosis is important to delivery correct therapy, prolong lifetime and reduce secondary effects;
- A **diagnostic test** is used to determine the presence or absence of a disease when a subject shows signs or symptoms of the disease;
- A **screening test** identifies asymptomatic individuals who may have the disease;
- The diagnostic test is performed **after** a positive screening test to establish a definitive diagnosis.

Diagnostic tests can have multiple uses, including:

patient management, especially when clinical symptoms are not specific for a particular infection (as is often the case);

screening for asymptomatic infections; surveillance;

epidemiological studies (for example, rapid assessments of disease burden or outbreak investigations);

evaluating the effectiveness of interventions, including verification of elimination;

detecting infections with markers of drug resistance.

Some Common Screening Tests:

- Pap smear for cervical dysplasia or cervical cancer
- Fasting blood cholesterol for heart disease
- Fasting blood sugar for diabetes
- Blood pressure for hypertension
- Mammography for breast cancer
- PSA test for prostate cancer
- Fecal occult blood for colon cancer
- Ocular pressure for glaucoma
- PKU test for phenolketonuria in newborns
- TSH for hypothyroid and hyperthyroid

Important parameters to define a Screening Tests:

- The most basic parameters that need to be established regarding any clinical test are that it demonstrates a sufficient degree of **reliability** and **validity**;

- Reliability** refers to the consistency and repeatability of outcomes as measured by the clinical test;

- Validity** refers to whether the clinical test is accurate in measuring what it is purporting to measure. The parameters to measure the validity of a method are *sensitivity, specificity, predictive values, and likelihood ratios*.

- These parameters are easily measured for serology and molecular-based tests but not for microscopy where the experience of the examiner gives the **highest confidence**

Glossary

Accuracy

The percentage of correct results obtained by the test under evaluation compared with the results of a reference or 'gold standard' test. Usually expressed as the number of correct results divided by the total number of results, multiplied by 100.

Blinding

Interpreting a test result without knowledge of a patient's condition or previous test results.

Confidence interval

The confidence interval quantifies the uncertainty in measurement; usually reported as the 95% confidence interval, the range that we can be 95% certain covers the true value.

Negative predictive value (NPV)

The probability that a negative result accurately indicates the absence of infection.

Positive predictive value (PPV)

The probability that a positive result accurately indicates the presence of infection.

Prevalence

The proportion of a given population with an infection at a given time.

Proficiency panel

A collection of six or more mock or true specimens with positive and negative results for a particular test, used to ascertain the proficiency of the technologist in performing the test.

Quality assurance (QA)

An ongoing process of monitoring a system for reproducibility or reliability of results, with which corrective action can be instituted if standards are not met.

Reference standard

The best available approximation of a true result, generally indicating a test method that is currently accepted as reasonably, but not necessarily, 100% accurate. It is used as the reference method for assessing the performance characteristics of another test method.

Reproducibility

A measure of the extent to which replicate analyses using identical procedures agree with each other.

Sensitivity

The probability (percentage) that patients with the infection (determined by the result of the reference or 'gold standard' test) will have a positive result using the test under evaluation.

Specificity

The probability (percentage) that patients without the infection (determined by the result of the reference or 'gold standard' test) will have a negative result using the test under evaluation.

Tests

Any method for obtaining additional information regarding a patient's health status.

| | | Condition | |
|-------------|----------|-----------|--------|
| | | Present | Absent |
| Test Result | Positive | a | b |
| | Negative | c | d |

a = “True Positives” Sensitivity = $a/(a + c)$

b = “False Positives” Specificity = $d/(b + d)$

c = “False Negatives” Positive predictive value = $a/(a + b)$

d = “True Negatives” Negative predictive value = $d/(c + d)$

Sensitivity: The ability of the test to identify correctly those **who have** the disease

Specificity: The ability of the test to identify correctly those who **do not have** the disease

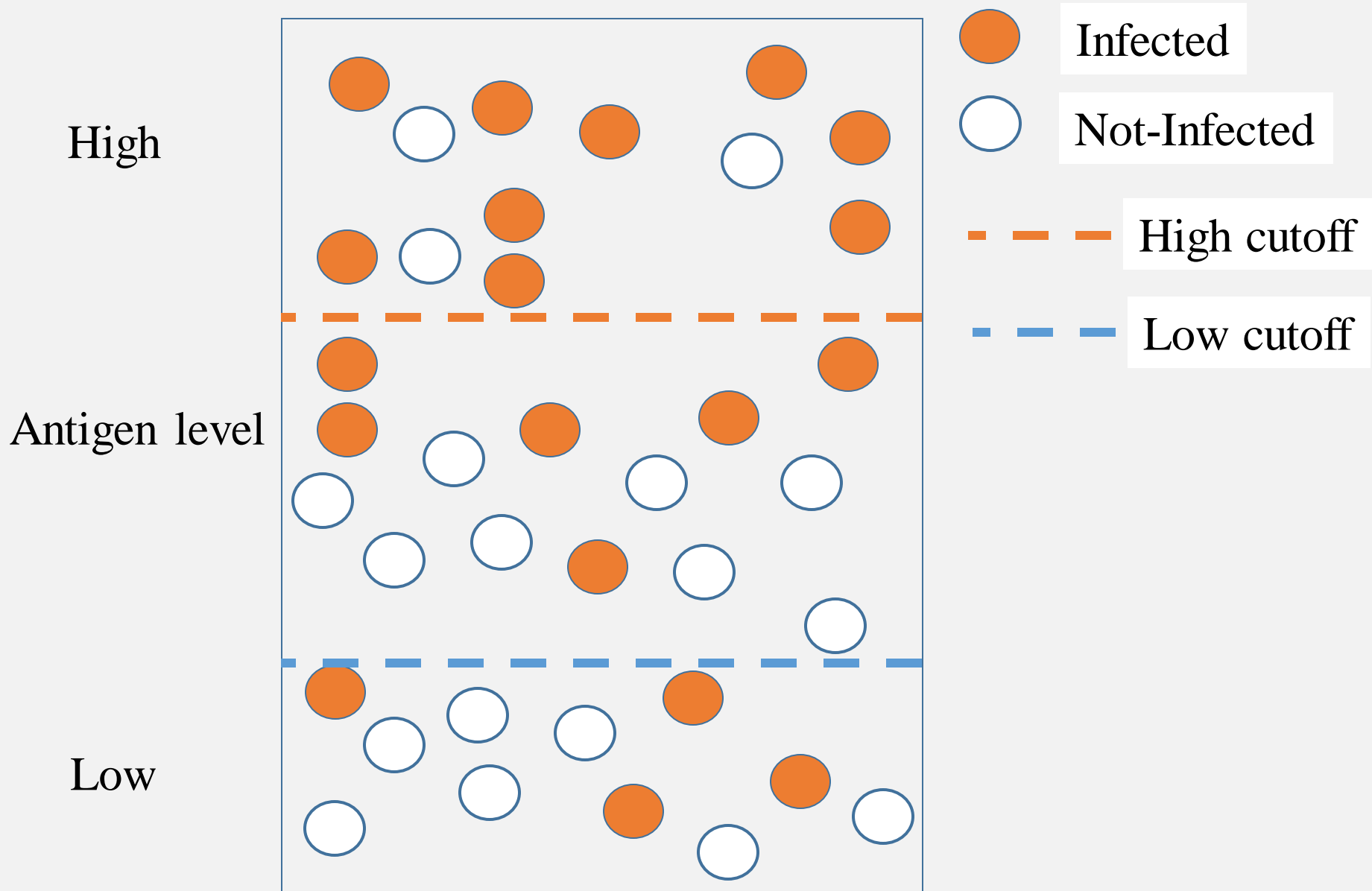
Example of specificity and sensitivity concepts of a Screening Test:

- Assume a population of 1,000 people
- 100 have a disease
- 900 do not have the disease
- A screening test is used to identify the 100 people with the disease

| Screening Results | True Characteristics in Population | | Total |
|-------------------|------------------------------------|------------|-------|
| | Disease | No Disease | |
| Positive | 80 | 100 | 180 |
| Negative | 20 | 800 | 820 |
| Total | 100 | 900 | 1,000 |

Sensitivity = $80/100 = 80\%$ **Specificity** = $800/900 = 89\%$

Effect of determining cut points for a diagnosis



Effect of determining cut points for a diagnosis

Different cut-points yield different sensitivities and specificities;

The cut-point determines how many subjects will be considered as having the disease;

The cut-point that identifies more true negatives will also identify more false negatives;

The cut-point that identifies more true positives will also identify more false positives.

Where to set the cutoff point

Ideally any diagnostic test should have 100% specificity and sensitivity;

- If the diagnostic (confirmatory) test is expensive or invasive:

Minimize false positives or Use a cut-point with high specificity

- If the penalty for missing a case is high (e.g., the disease is fatal and treatment exists, or disease easily spreads):

Maximize true positives

That is, use a cut-point with high sensitivity

- Balance severity of false positives against false negatives

ASSURED criteria for diagnostic methods:

- Affordable by those at risk of infection
- Sensitive with very few false-negatives
- Specific with very few false-positives
- User-friendly tests that are simple to perform and require minimal training
- Rapid, to enable treatment at first visit, and
- Robust, for example not requiring refrigerated storage
- Equipment-free
- Delivered to those who need it

WHO definition

Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles

The TDR Diagnostics Evaluation Expert Panel

The Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy (STARD) initiative

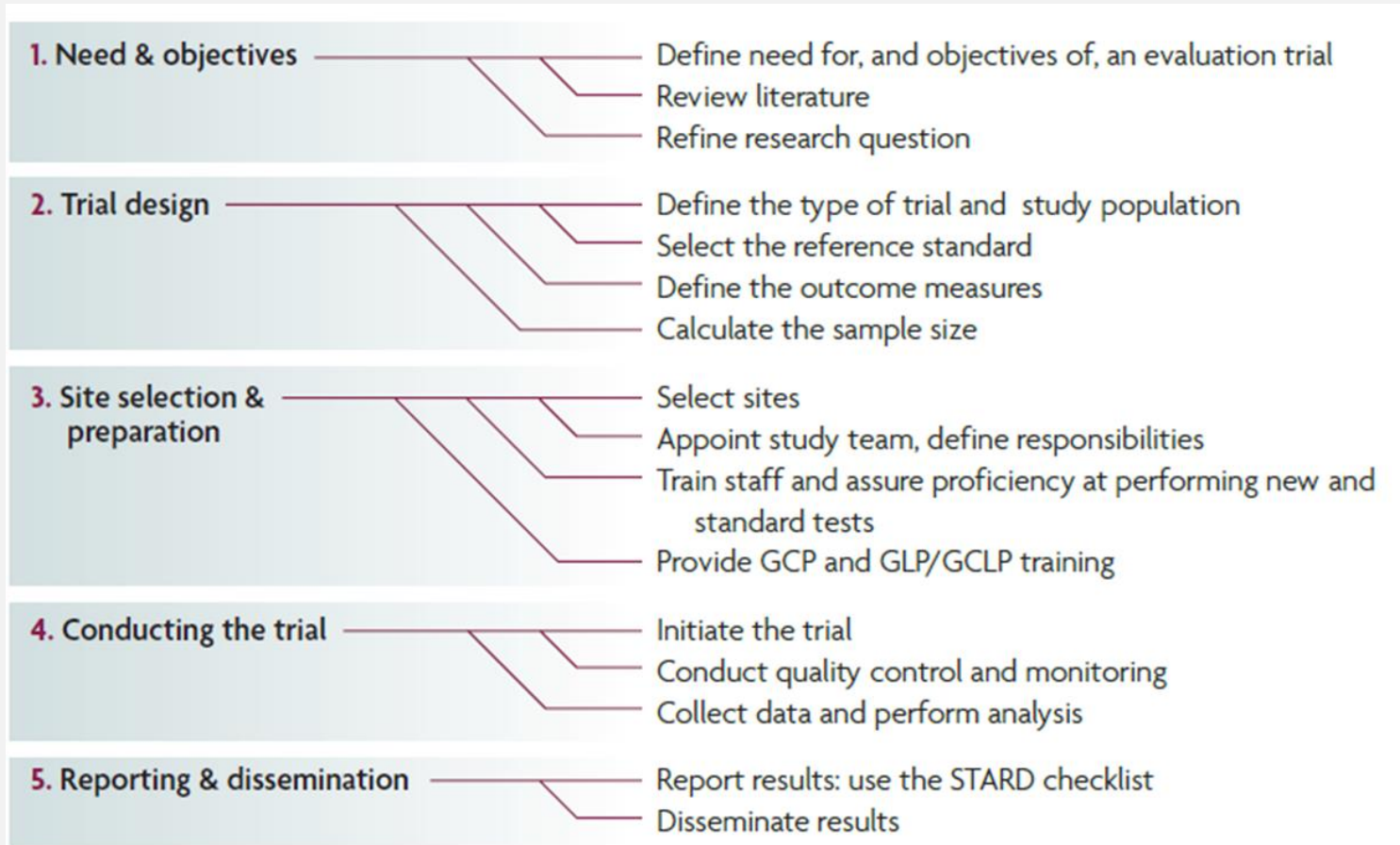


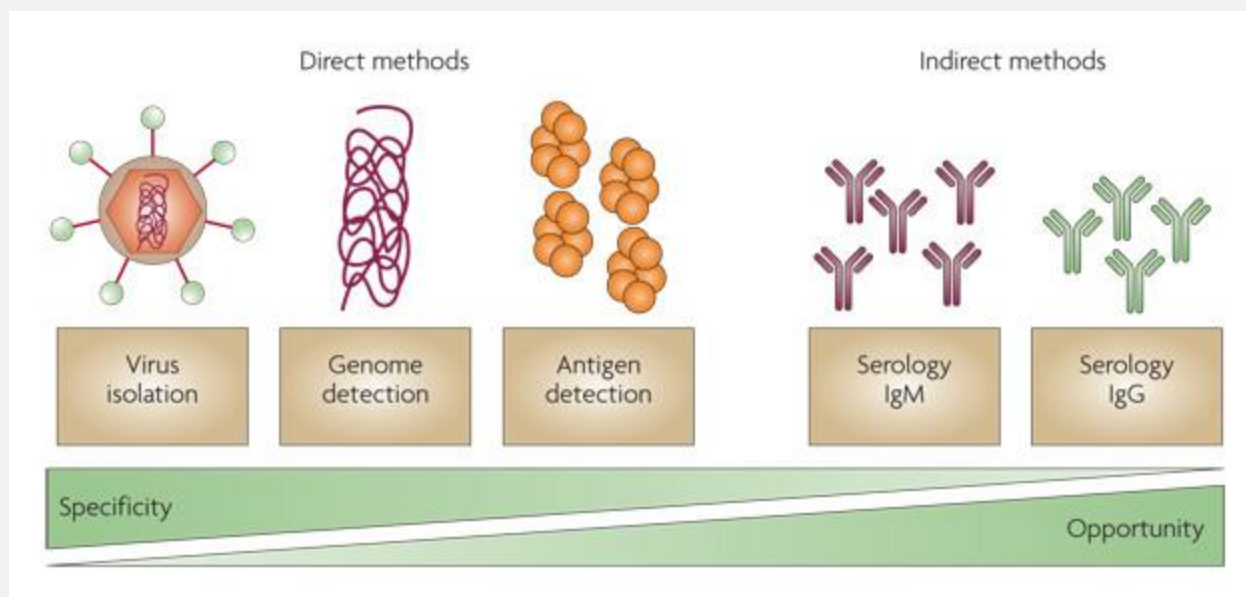
Figure 1 | **Essential elements in designing diagnostic test evaluations.** GCP, good clinical practice; GCLP, good clinical laboratory practice; GLP, good laboratory practice; STARD, standards for reporting of diagnostic accuracy. See Section III, 2.13.

Diagnostic methods for parasite diseases

1. Methods for the diagnosis of infectious diseases **have stagnated in the last 20–30 years** but has been revived in the last years;
2. The **detection and diagnosis of parasite infections** rely on several laboratory methods in addition to clinical symptoms, clinical history, travel history, and geographic location of patient.
3. The primary tests currently used to diagnose many parasitic diseases have changed little since the **development of the microscope in the 15th century by Antonie van Leeuwenhoek**;
4. Although several test have been made they are not currently implemented;
5. Most of the current tests **cannot distinguish between past, latent, acute, and reactivated infections** and are not useful for following response to therapy or for prognosis;
6. Pressing needs include more rapid tests without sacrificing sensitivity, value-added tests, and point-of-care tests for both high- and low-resource settings.

How a test can be?

Laboratory tests may identify organisms **directly** (eg, visually, using a microscope, growing the organism in culture, identifying antigens) or **indirectly** (eg, identifying antibodies to the organism).



For example: Direct and indirect diagnostic tests for dengue

Direct diagnostic methods such as dengue virus isolation, genome detection, and antigen detection are more specific ways to diagnose dengue than indirect methods that detect IgM and IgG antibodies against dengue. There is a greater opportunity for diagnosis with the indirect tests because these diagnostic methods are typically the most practical options available. 2010 [Nature Publishing Group](#) Peeling, R. W. *et al.* Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature Reviews Microbiology* **8**,S30–S37 (2010). All rights reserved.

Diagnostic methods for parasite diseases

- Methods for the diagnosis of infectious diseases can be divided in:

1. Microscopy;

2. Culture;

3. Serology-based assays;

4. Molecular-based approaches (DNA);

5. Molecular-based approaches (Proteins);

6. Molecular-based approaches (Metabolites);

Path of Workflow

THE PATIENT → **Test selection** → **Sample Collection**

Preexamination Phase

Sample Transport

Laboratory Analysis
Examination Phase

Report Transport

Report Creation

Result Interpretation

Post examination Phase



Características dos tratamentos

Too High



Toxicity

Premature treatment termination

Compromised immunity

Higher treatment costs

A blue rounded rectangular box containing two white wavy lines that create a central channel. The text 'Optimal Therapeutic Range' is centered within this channel.

Optimal Therapeutic Range

Too Low



Lack of therapeutic response

Poor outcomes

Higher cost of recurrence / progression

Diagnostic methods for blood-borne parasite diseases used by CDC and NRCP Reference Centers

| | African trypanosomiasis <i>Trypanosoma brucei</i> species | Babesiosis <i>Babesia microti</i> | Chagas disease <i>Trypanosoma cruzi</i> | Leishmaniasis <i>Leishmania</i> species | Malaria <i>Plasmodium</i> species | Toxoplasmosis <i>Toxoplasma gondii</i> |
|-----------------------|--|--------------------------------------|--|--|--------------------------------------|---|
| CDC DIAGNOSTIC TOOLS | Microscopy | Microscopy IFA, PCR | Microscopy culture, IFA, EIA | Microscopy, Culture, IFA | Microscopy PCR, IFA | Microscopy IFA, EIA |
| NRCP DIAGNOSTIC TOOLS | Microscopy, culture, CATT, PCR | Microscopy, IFA | Microscopy, culture, EIA, RT-PCR | Microscopy, Culture, IFA, RT-PCR | Microscopy, IFA, IB, PCR | RT-PCR |

CDC: Centre for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA. NRCP: National Reference Centre for Parasitology, Montreal General Hospital, Montreal, Quebec, Canada. Abbreviations: see Table 1.

PCR: polymerase chain reaction; RT-PCR: reverse transcriptase PCR; IFA: immunofluorescence antibody
CATT: Card Agglutination Test for Trypanosomiasis; IB: immunoblotting

Diagnostic methods for intestinal parasite diseases used by CDC and NRCP Reference Centers

| | PROTOZOA | TREMATODES | | CESTODES | | NEMATODES | |
|-----------------------------|---|--|----------------------------------|----------------------------|---|--|------------------------------------|
| | Cryptosporidiosis | Fasciolosis | Schistosomiasis | Taeniasis Cysticercosis | Hydatidosis | Filariasis | Strongyloidiasis |
| | <i>Cryptosporidium parvum, C. hominis</i> | <i>Fasciola hepatica, F. gigantica</i> | <i>Schistosoma mansoni</i> | <i>Taenia solium</i> | <i>Echinococcus granulosus, E. multilocularis</i> | <i>Wuchereria bancrofti, Brugia malayi, B. timori, Loa loa</i> | <i>Strongyloides stercoralis</i> |
| CDC DIAGNOSTIC TOOLS | Microscopy, EIA, PCR, RT-PCR | — | Microscopy, FAST-ELISA, IB | Immunoblot, | IB | Microscopy, EIA | Microscopy, EIA |
| NRCP DIAGNOSTIC TOOLS | Microscopy, EIA | Microscopy, EIA | Microscopy, EIA | IB | EIA | Microscopy, EIA | Microscopy, culture, EIA, IB |

CDC: Centre for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA. NRCP: National Reference Centre for Parasitology, Montreal General Hospital, Montreal, Quebec, Canada.

PCR: polymerase chain reaction; RT-PCR: reverse transcriptase PCR; IFA: immunofluorescence antibody
 CATT: Card Agglutination Test for Trypanosomiasis; IB: immunoblotting; EIA: enzyme immunoassay

Diagnostic of Blood-borne Parasites

- Within the hemoparasites we can find protozoa and Helminths such as *T.cruzi*, *T.brucei*, *Plasmodium vivax*, *P.falciparum*, *P.malariae*, *Babesia*, *Wuchereria bancrofti*, *Mansonella ozzardi*...;
- *Plasmodium* and *Babesia* are found within the red blood cells while Trypanosoma are detected outside red blood cells. The amastigote stage of *Leishmania* is occasionally found in monocytes;
- Microscopy has been the most widely used tool available for the detection of parasites through inspection of **blood smears**;

Microscopy (I)

- Microscopy **advantages:**

1. direct observation,
2. Simple and relatively low cost,
3. can be applied to still the first and most widely used screening assay in
Parasitology

- Microscopy **disadvantages:**

1. dependent on analyst experience,
2. time-consuming,
3. low-throughput



Introduction

▼ Protozoa training

- Malaria
- Intestinal Flagellates And Ciliates
- Blood And Tissue Flagellates
- Intestinal Coccidia
- Intestinal Amoeba

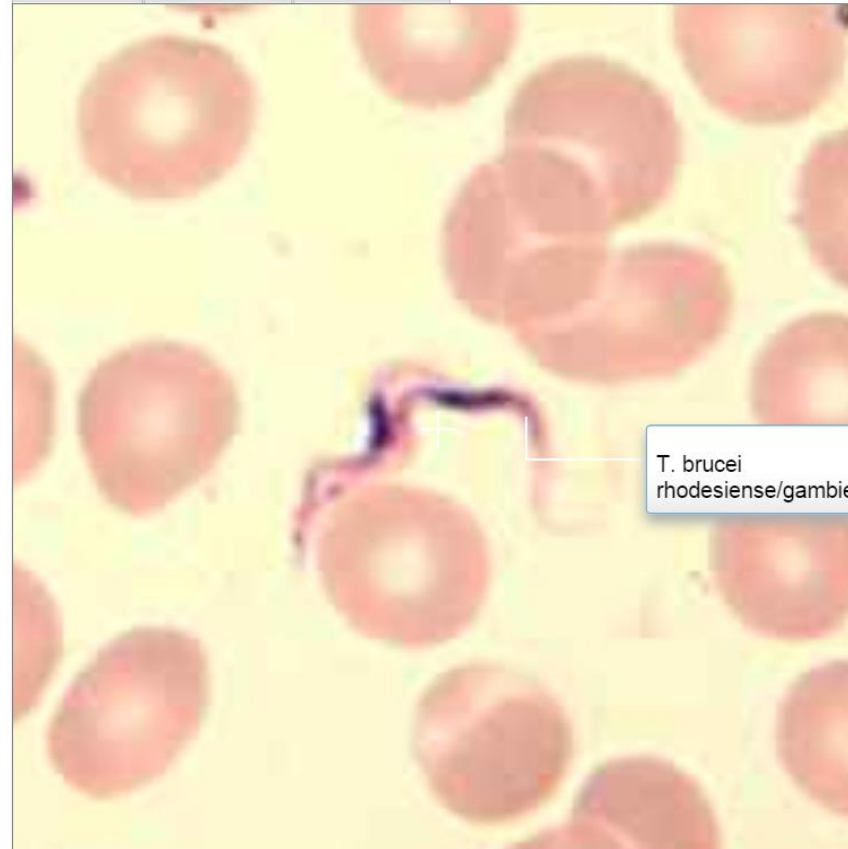
▼ Helminths training

- ▶ nematodes
- ▶ trematodes
- ▶ cestodes

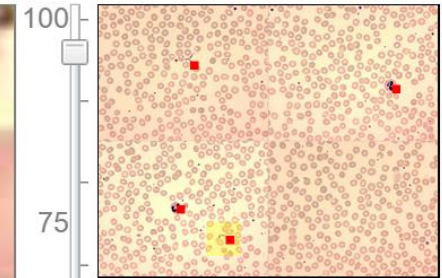
▶ Basic exercises

▶ Advanced exercises

View ▾ Labels ▾ Images ▾



Thin film, stained with Giemsa



Display Width : 52.06 μ m

Position : 181.28 μ m / 341.44 μ m

□ Startposition

■ Endposition

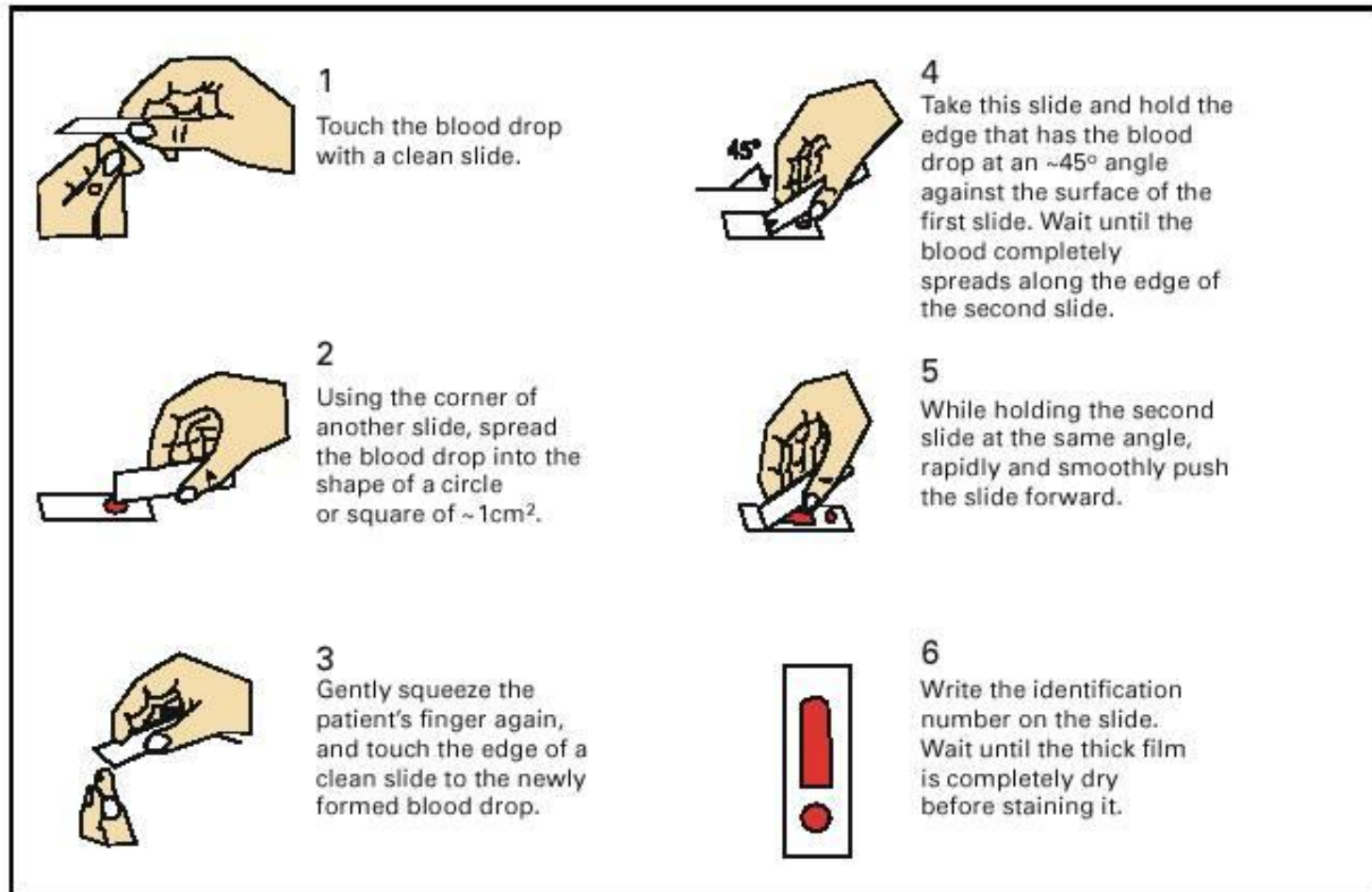
Distance: 0.00 μ m

Microscopy (II)

- Microscopy has been the only tool available for the detection of parasites through inspection of **blood smears, tissue specimens, feces, lymph node aspirates, bone marrow**, and even **cerebrospinal fluid**;
- Blood smears can be **thin** and **thick**;
- Blood smears can be analyzed **fresh** or after **staining**;
- The Blood smears are prepared using blood collected in tubes with **anticoagulants** or after **centrifugation** depending on the level of parasitemia;
- The techniques for concentration **increase the sensibility** of the method especially when the level of parasites is low and when there it is difficult to confirm the diagnosis;

Blood smear preparation

Figure A-2. Preparation of a thin and a thick blood film on the same slide.

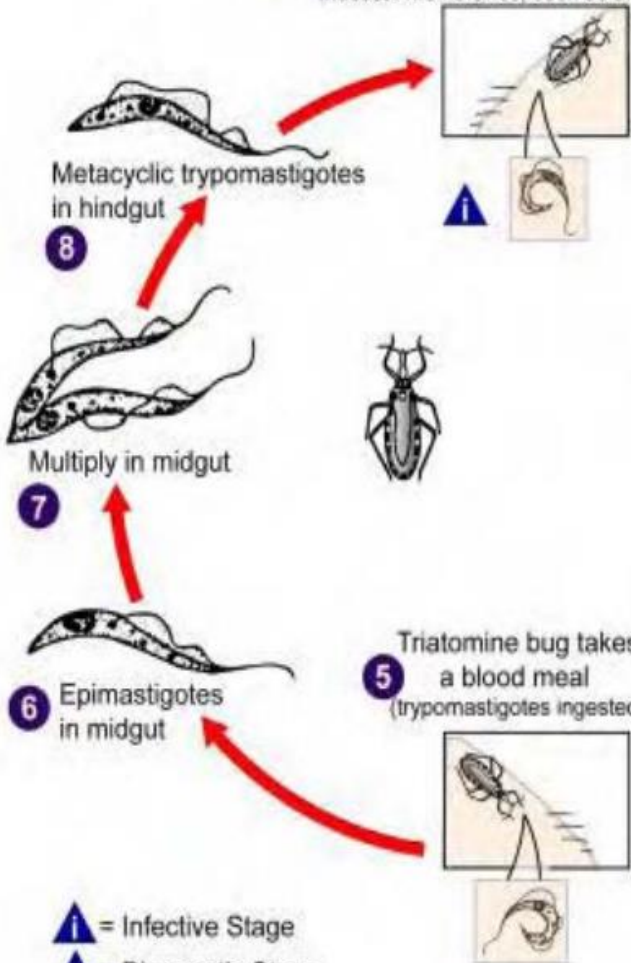


Trypanosomiasis, American (Chagas disease)

(*Trypanosoma cruzi*)

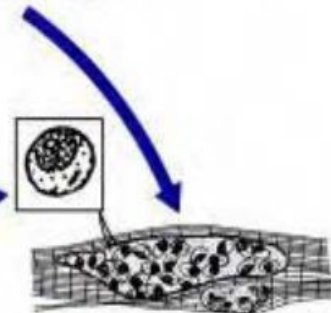
Triatomine Bug Stages

1 Triatomine bug takes a blood meal (passes metacyclic trypomastigotes in feces, trypomastigotes enter bite wound or mucosal membranes, such as the conjunctiva)



Human Stages

2 Metacyclic trypomastigotes penetrate various cells at bite wound site. Inside cells they transform into amastigotes.



3 Amastigotes multiply by binary fission in cells of infected tissues.

Trypomastigotes can infect other cells and transform into intracellular amastigotes in new infection sites. Clinical manifestations can result from this infective cycle.



4 Intracellular amastigotes transform into trypomastigotes, then burst out of the cell and enter the bloodstream.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

- O diagnóstico parasitológico **na fase aguda** da doença de Chagas baseia-se na detecção de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, por meio da **observação microscópica de amostras de sangue** ou de métodos indiretos
- A infecção chagásica em sua **fase crônica** apresenta parasitemias sangüíneas **muito baixas e irregulares**. Dessa forma, a detecção parasitológica do *T. cruzi* nesta fase é feita por métodos indiretos (hemocultura e xenodiagnóstico). Embora apresentem alta especificidade, estes métodos são laboriosos e sua sensibilidade, baseada em apenas um exame, varia de 40% a 50% nos diferentes estudos realizados

CONSIDERAÇÕES GERAIS

- **The diagnosis of infection** with *T. cruzi* is complex, mainly during the **chronic phase**, due to the lack of symptoms and the low or intermittent parasitemia;
- **Currently no reference test is available. Pan American Health Organization (PAHO)** suggested that at least **two assays** based on different techniques may be used in parallel to increase diagnostic accuracy because a single assay is not considered sufficiently sensitive and specific for the **chronic phase**

T.cruzi diagnosis

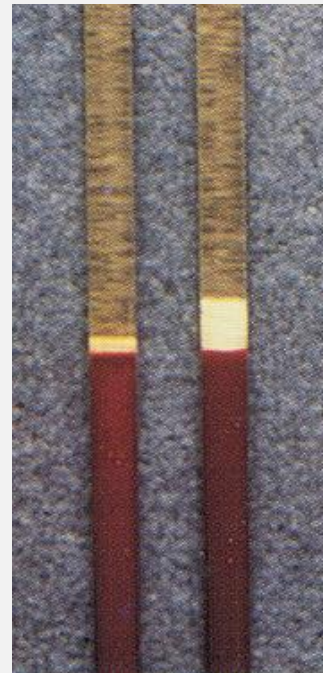
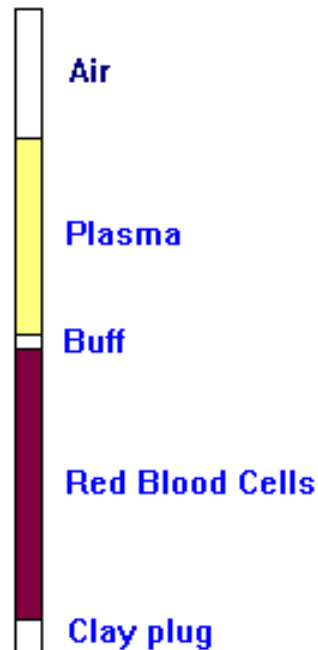
- **Exame direto ou a fresco** — Para realização desta técnica, uma pequena gota de sangue, obtida por punção da polpa digital ou de sangue venoso colhido com anticoagulante, é colocada entre lâmina e lamínula e examinada exaustivamente ao microscópio em objetiva de (40X).
- **Método de Strout modificado** — Consiste em coletar o sangue em tubo capilar e após centrifugação a baixa rotação, examinar entre lâmina e lamínula o material da interface entre as hemácias e o creme leucocitário (buffy coat).
- **Preparações coradas** — O esfregaço delgado (ou estirado) e a gota espessa devem ser preparados e corados pelo método de Giemsa ou de Leishman.

CENTRIFUGAÇÃO DO SANGUE (CREME LEUCOCITÁRIO)

A **concentração do sangue** pela centrifugação é o mais simples procedimento para a pesquisa de parasitos **no creme leucocitário**. Esse método é empregado para a detecção da *Leishmania donovani*, de tripanossomos e de microfilárias no sangue periférico

buffy coat - The thin pale (white, gray or yellow) layer of white blood cells and platelets which is found on top of the mass of red blood cells when whole blood is centrifuged.

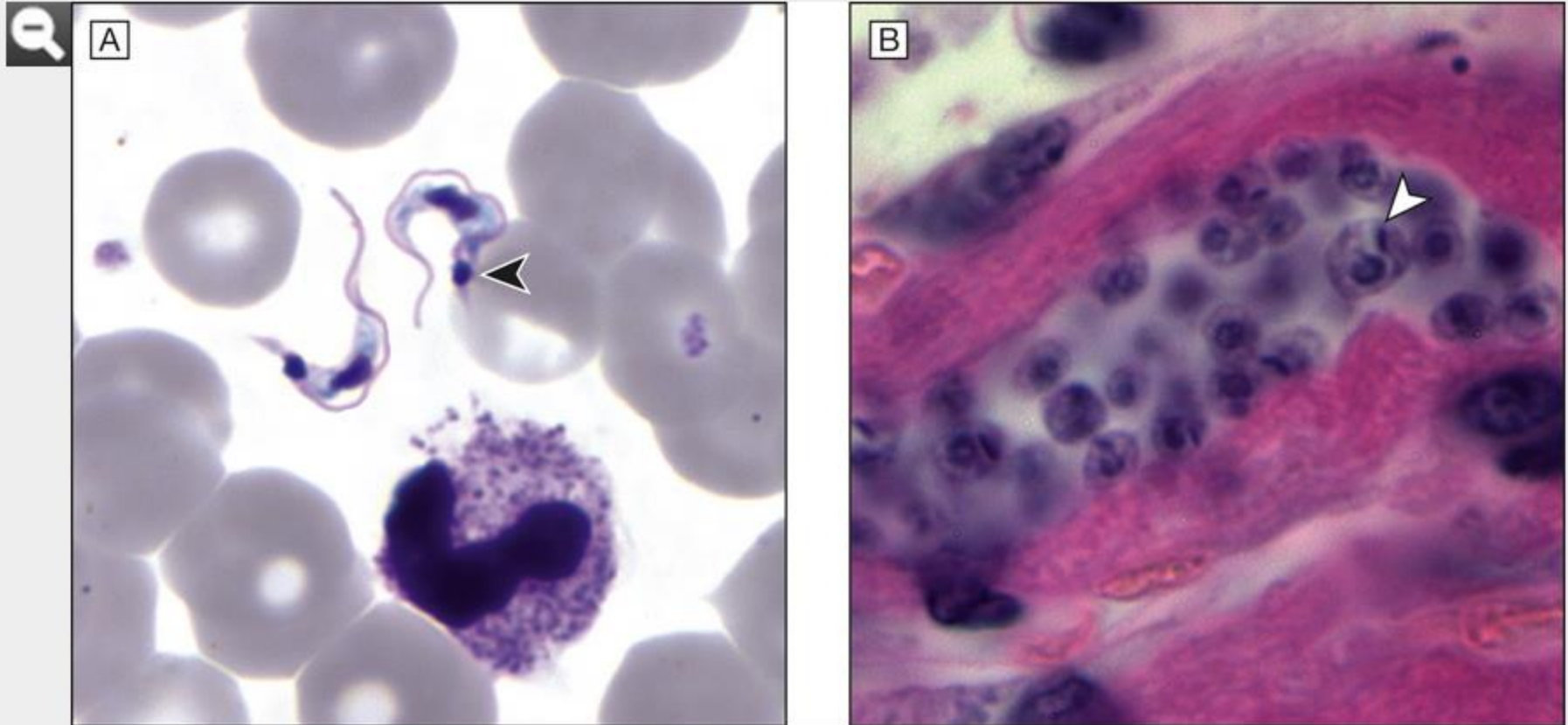
hematocrit (HCT) - The percentage by volume of packed red blood cells in a given sample of blood after centrifugation; the average for healthy adults is 45%. aka PCV = packed cell volume



Microscopy diagnostic of *T. cruzi*

Figure 2. *Trypanosoma cruzi*

A, The trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* in a peripheral blood smear from a patient with acute Chagas disease. Arrowhead indicates the kinetoplast (Giemsa stain, original magnification $\times 1000$). B, Nest of *T. cruzi* amastigotes within a cardiac myocyte in a patient with chronic Chagas disease. Arrowhead indicates the kinetoplast (hematoxylin-eosin, original magnification $\times 1000$). Courtesy of the Division of Parasitic Diseases, US Centers for Disease Control and Prevention.



Serologia

- Serological methods are based on the detection of specific parasite antigens or host antibodies (**IgG, IgM, IgA**) against these antigens in serum but also in other biofluids such as urine, saliva, CSF...;
- Can be used to identify the infecting agent evaluate the course of an infection, or determine the nature of the infection-whether it is a primary infection or a reinfection, and whether it is acute or chronic.
- Serologic testing is used to identify agents that are difficult to isolate and grow in the laboratory or that cause diseases that progress slowly
- Serologic assay = immunoassay;

Serologia

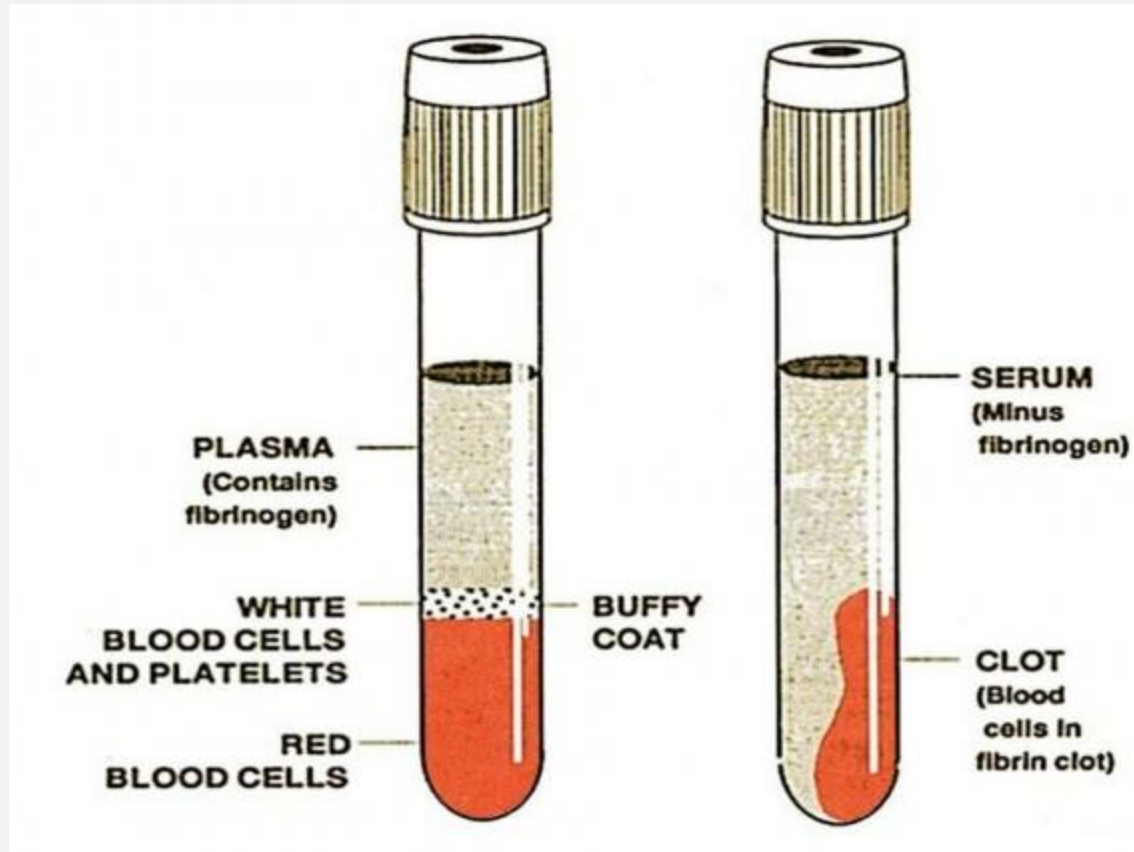
Advantages:

1. Sensitive;
2. Rapid;
3. Can be standardized and run in highthroughput with automation;
4. In the majority of cases they represent the gold-standard method;

Disadvantages:

1. requires high cost material and equipment;
2. Cross-reactivity due to common epitopes;
3. Requires quality control.

Blood, Plasma and Serum

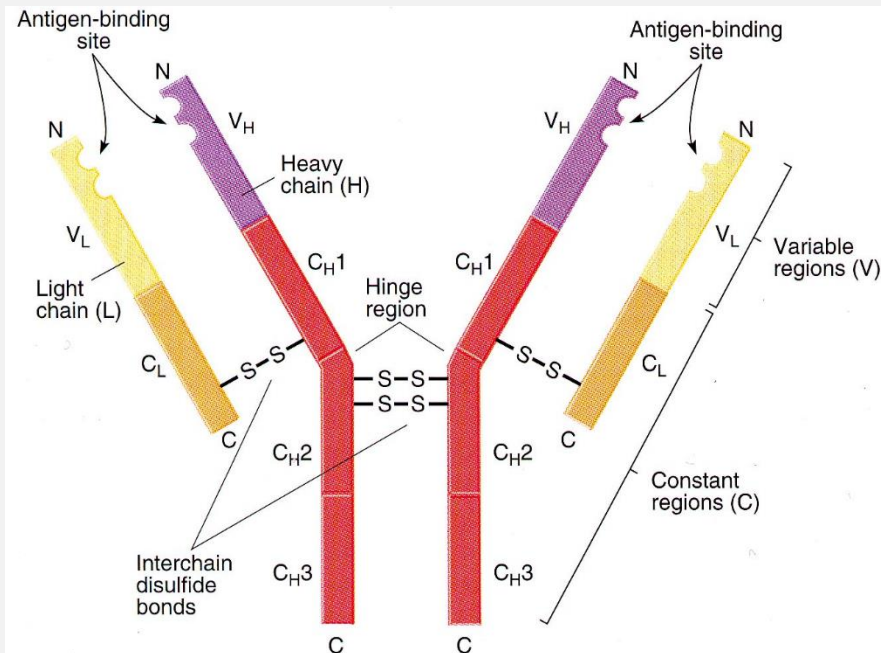


MÉTODOS SOROLÓGICOS

- O diagnóstico sorológico da infecção chagásica baseia-se na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* das classes IgM e IgG no soro do paciente, dependendo da fase da infecção. Os testes sorológicos em geral apresentam uma alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico laboratorial da infecção chagásica humana.
- A presença de outras parasitoses, como esquistossomose, leishmaniose, toxoplasmose e rangeliense, apresenta reações sorológicas com o *T. cruzi*.
- A coexistência de várias dessas doenças, como ocorre em grande parte dos países latino-americanos, torna-se um problema adicional no diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi*, levando ao aparecimento de resultados falso-positivos

Each **antibody molecule** has two parts:

- **Variable part:** This part varies. It is specialized to attach to a specific antigen.
- **Constant part:** This part is one of five structures, which determines the antibody's class—IgM, IgG, IgA, IgE, or IgD. This part is the same within each class and determines the function of the antibody. An antibody can switch its constant part and become a different class, but its variable part does not change. Thus, it can always recognize the specific antigen that it was formed to attach to.



Antibodies

IgM

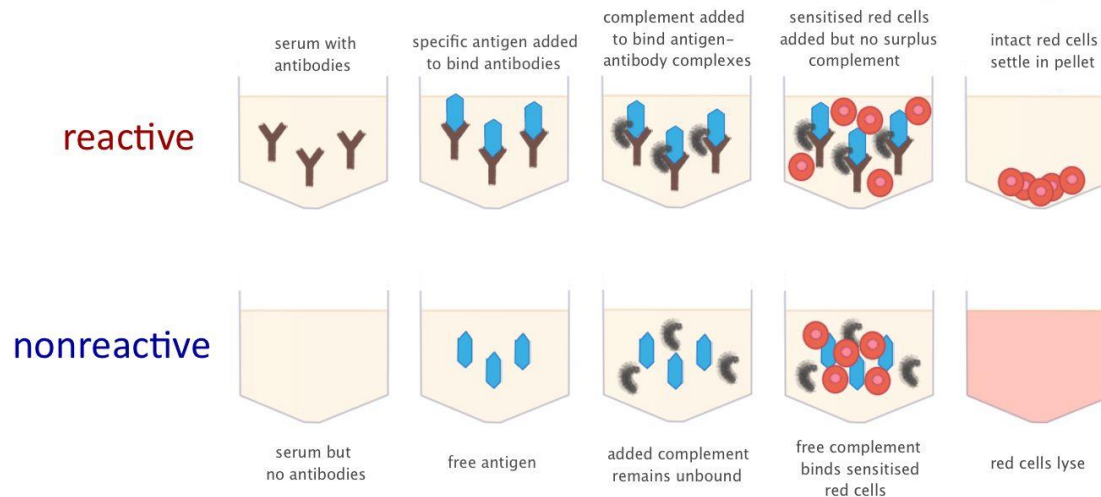
Produced when a particular antigen is encountered for the first time (primary immune response). IgM then attaches to the antigen, activating the complement system, and thus makes the microorganism easier to ingest. Normally, IgM is present in the bloodstream but not in the tissues.

IgG

IgG, the most prevalent class of antibody, is produced when a particular antigen is encountered again. More antibody is produced in this response (secondary immune response). The secondary immune response is also faster and the antibodies produced—mainly IgG—are more effective. IgG is present in the bloodstream and tissues. It is the only class of antibody that crosses the placenta from mother to fetus. The mother's IgG protects the fetus and infant until the infant's immune system can produce its own antibodies.

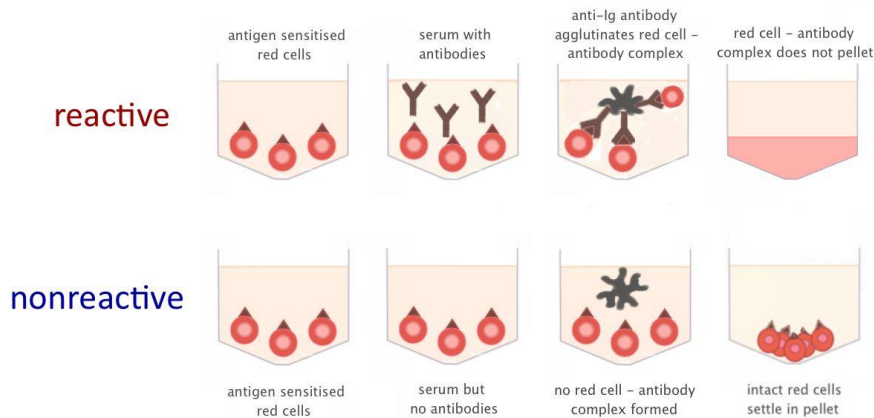
Reação de fixação do complemento (RFC) — Essa técnica, idealizada por Guerreiro e Machado para o diagnóstico da doença de Chagas, foi durante muito tempo a única técnica sorológica para detecção da infecção pelo *T. cruzi* disponível no mercado. O método utiliza um antígeno homólogo (extrato de formas de cultura de *T. cruzi*), sendo que a sensibilidade e especificidade desta técnica são tidas como controversas entre diferentes autores devido a várias dificuldades técnicas, como a falta de padronização de antígeno, a discordância de resultados entre diferentes laboratórios, fazendo com que a técnica, apesar de barata, esteja em desuso.

complement fixation test

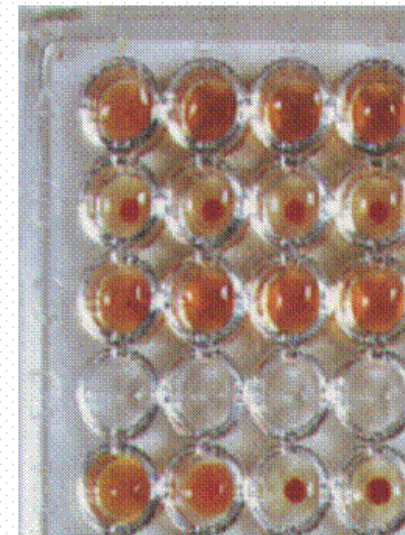


Teste de hemaglutinação (HA) — É uma técnica de **elevada sensibilidade**, largamente empregada na triagem de doadores em bancos de sangue, bem como no diagnóstico da **infecção crônica**. O método consiste em sensibilizar hemácias de carneiro fixadas com um extrato antigênico de *T.cruzi*. As hemácias sensibilizadas são depositadas em placa de 96 orifícios com o fundo em forma de “U”, na presença do soro-teste em diferentes diluições. Os anticorpos anti-*T. cruzi*, se presentes no soro, irão promover a aglutinação das hemácias formando uma rede. Estudos comparativos mostraram que a sensibilidade da HA é comparável à da **imunofluorescência indireta**.

indirect haemagglutination assay



tji 2013. Creative Commons

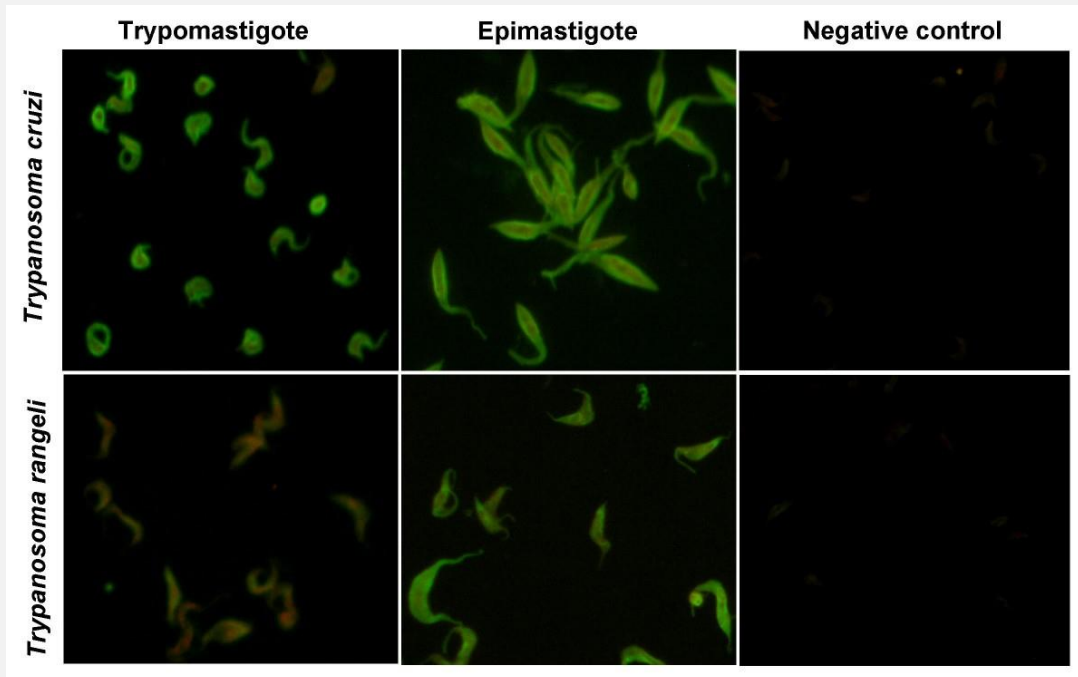


Positive Control **Negative Control**

Test
Positive
Negative
Positive

Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) — Essa técnica de elevada sensibilidade é utilizada tanto na triagem de doadores de sangue como no diagnóstico da infecção aguda e crônica pelo *T. cruzi*.

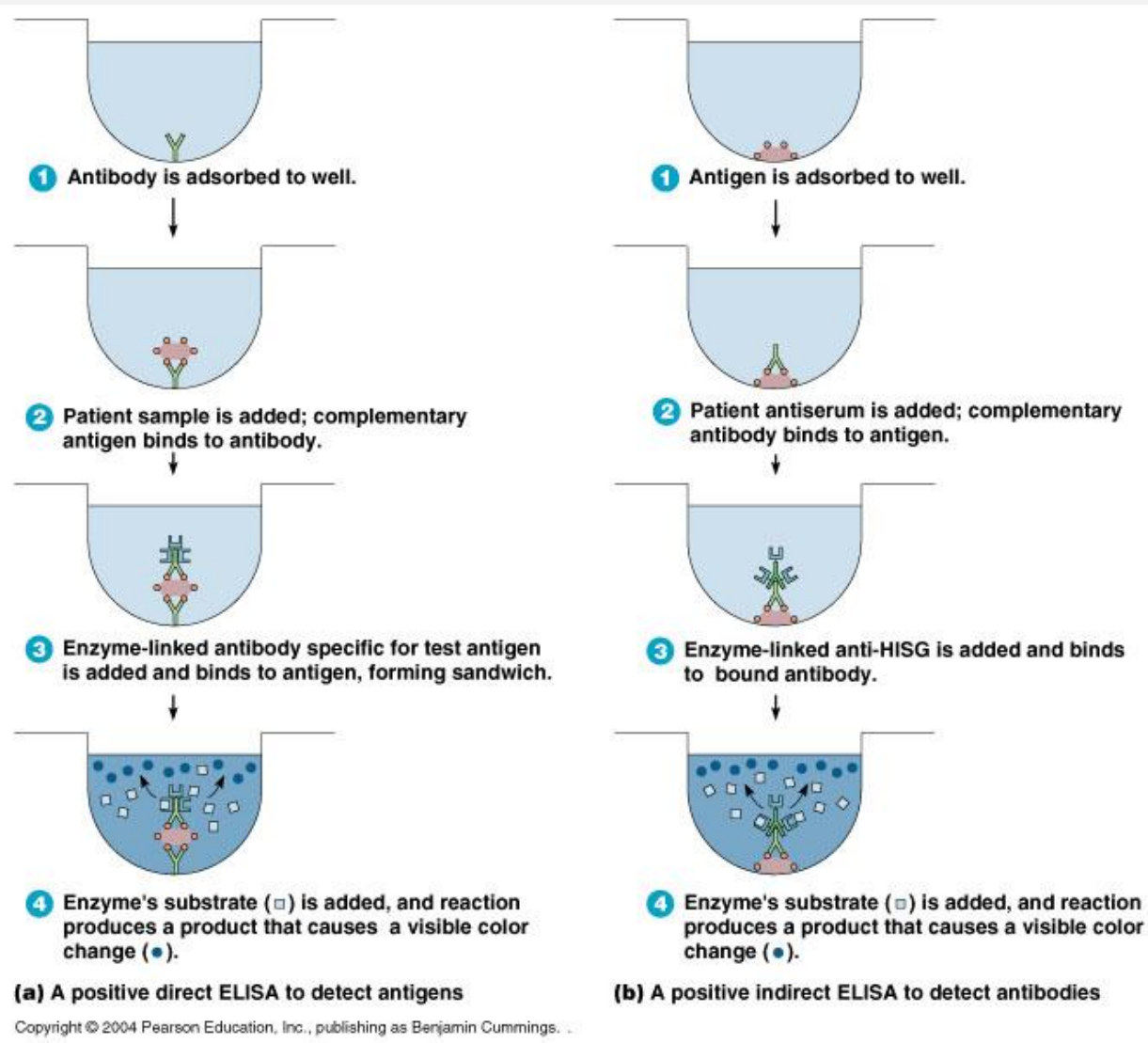
Cultura de *T. cruzi* colhidas são fixadas em paraformaldeído a 2%. Os parasitos são distribuídos sobre orifícios de lâminas próprias para imunofluorescência e incubados a 37°C por uma hora com o soro diluído. As lâminas são incubadas com um conjugado fluoresceinado anti-IgG ou anti-IgM humana por 60 minutos e observadas em microscópio de fluorescência.



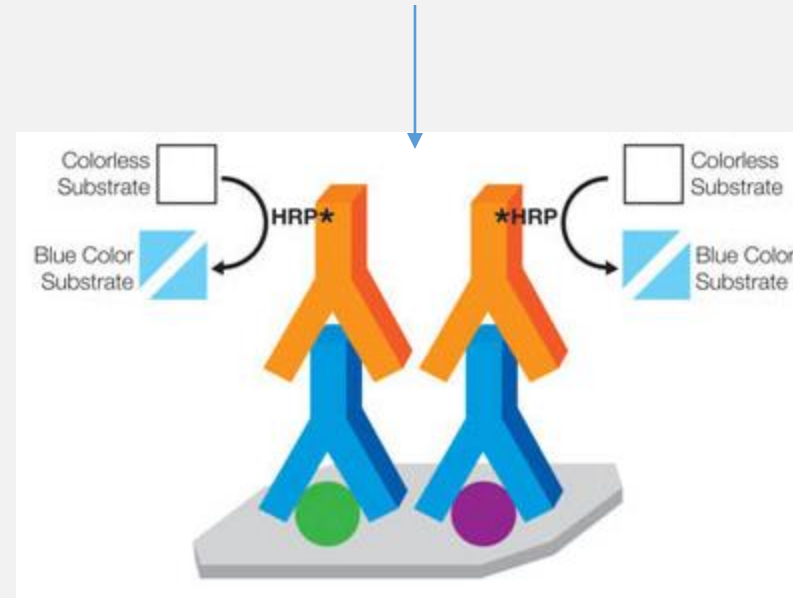
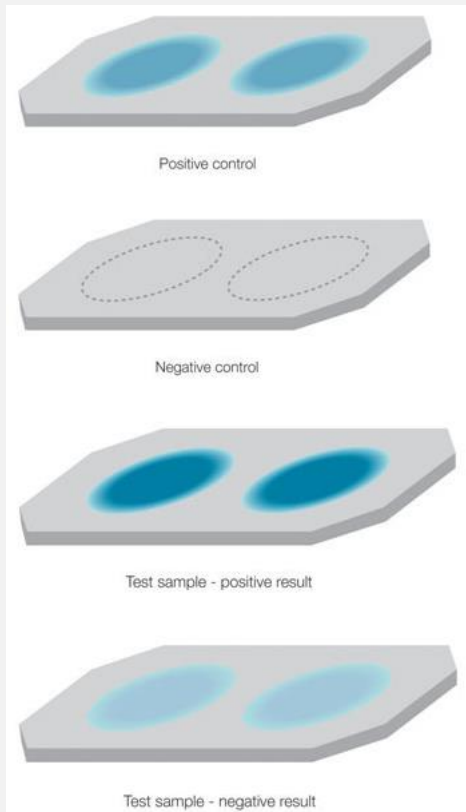
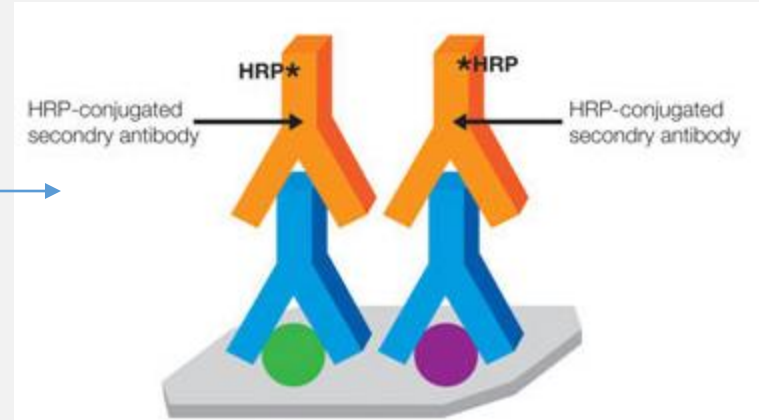
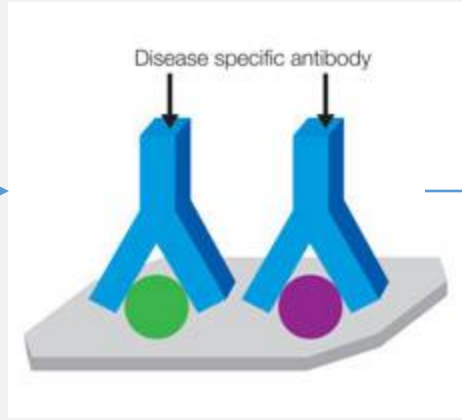
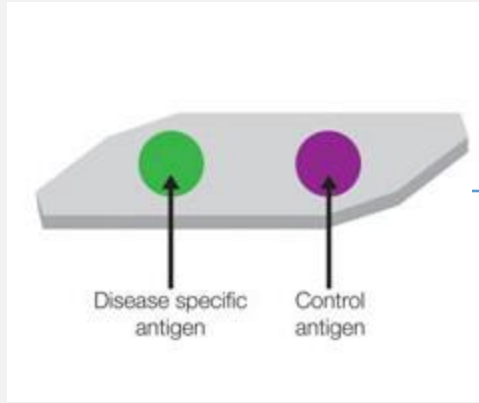
Ensaio imunoenzimático (ELISA) —

- Este método imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) é **altamente sensível e específico** e permite pesquisar as subclasses de imunoglobulinas envolvidas na resposta imune direcionada contra o *T. cruzi*.
- O ensaio é realizado em placas, onde os orifícios da placa são **sensibilizados com preparações antigênicas** obtidas a partir de formas de cultura de *T. cruzi* ou com proteínas recombinantes. Depois da adição do soro utiliza-se um anti-IgG conjugado marcado com uma enzima, em geral a peroxidase. Após a adição de um substrato específico, que é consumido na presença da enzima, a reação gera um produto colorido.
- Um dos grandes problemas no diagnóstico sorológico são as **reações inconclusivas ou de título limítrofe**. Nestes casos a confirmação diagnóstica deve ser feita com novas amostras, antígenos clonados ou mesmo peptídeos sintéticos



Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay



Dot Enzyme Immunoassay



ELISA diagnostic kits or T.cruzi detection

| Company | Name | Serological test |
|---|--|-------------------------------|
| *  | ELISA cruzi® | Total parasite extract |
| *  | Bioelisa Chagas® | Recombinant antigens |
| Lemos | Chagatek Elisa® | Total parasite extract |
| Ortho | <i>T.cruzi</i> ELISA Test System-1® | Total parasite extract |
| Ingen / Adaltis | EIAgen T.cruzi Ab® | Total parasite extract |
| Dade Behring | ELISA Novagnost® | Total parasite extract |

Reação em cadeia da polimerase (PCR) (*Polymerase Chain Reaction*)

- amplamente utilizada no diagnóstico de importantes doenças bacterianas, virais e parasitárias que afetam o homem, bem como na caracterização de seus diferentes agentes etiológicos.
- O método baseia-se na geração exponencial de cópias de fragmentos de DNA ou RNA através de uma síntese enzimática *in vitro*. Para tanto, utilizam-se oligonucleotídeos complementares a regiões flanqueadoras do fragmento do gene ou seqüência-alvo, iniciadores (*primers*).
- O diagnóstico é realizado pela observação de fragmentos de tamanho molecular esperados, revelados através da eletroforese do produto de amplificação em géis de agarose ou poliacrilamida.
- Os iniciadores descritos na literatura e dirigidos a seqüências de DNA nuclear, kDNA (DNA cinetoplástico) ou ao RNA do *T. cruzi*. Dentre esses, podemos citar alguns dirigidos aos genes do miniexon ou do rRNA 24S, aos minicírculos de kDNA ou ainda a seqüências repetitivas do DNA nuclear, os quais têm apresentado resultados promissores.

Reação de polimerase em cadeia

- Vantagens:

1. Sensibilidade, podendo detectar, em condições experimentais, até cerca de 1 a 0,1fg do DNA total do *T. cruzi*, o que equivale a cerca de 1/3 a 1/300 do DNA de um único parasito, respectivamente.
2. Can be automated with highthroughput;

- Desvantagens:

1. Muitos iniciadores apresentam reatividade cruzada com outros organismos geneticamente relacionados, como, por exemplo, o *T. rangeli* ou parasitos do gênero *Leishmania*;
2. elevado custo quando comparado com os métodos sorológicos convencionais
3. Necessita ser adaptada e otimizada a cada objetivo proposto

PCR

Reação de Polimerase em Cadeia em Cadeia

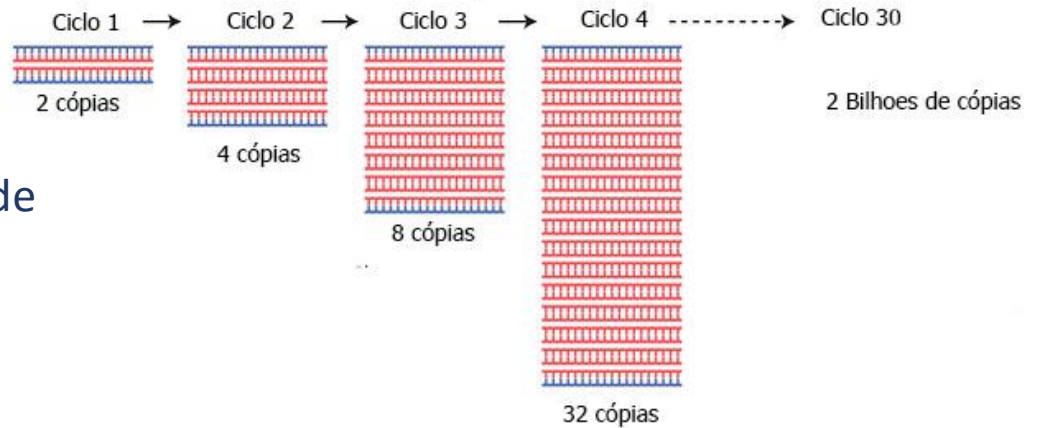


5' 3' Molécula alvo

5' 3' Denaturação

5' 3' Primer 3' Primer Pareamento

5' 3' Extensão



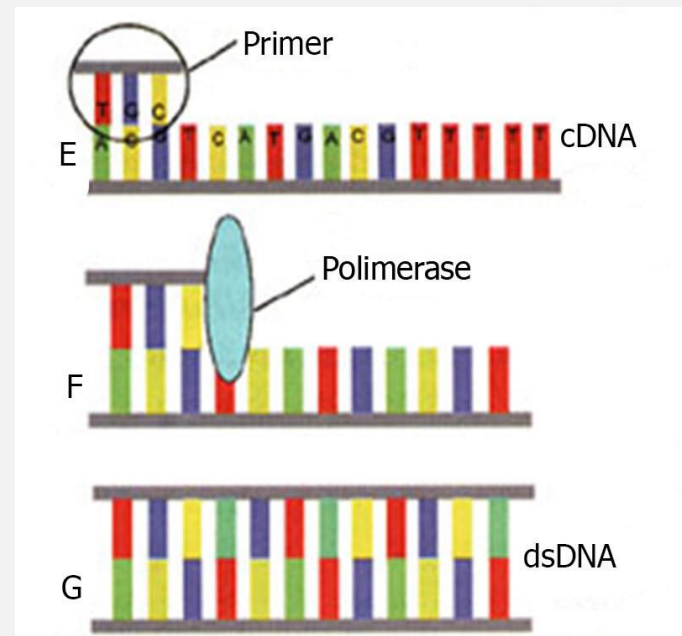
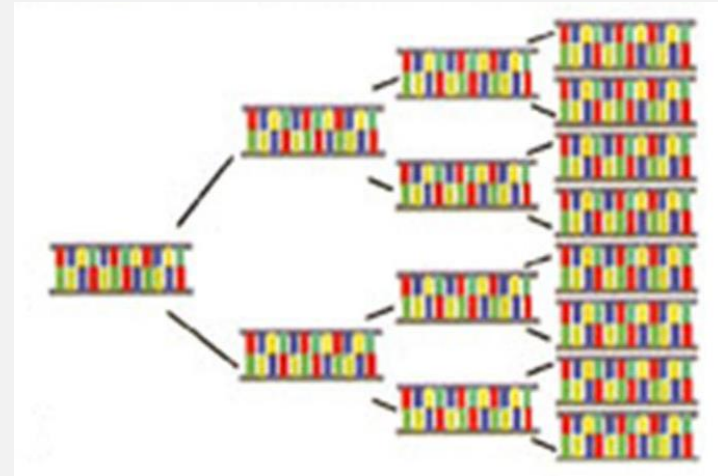
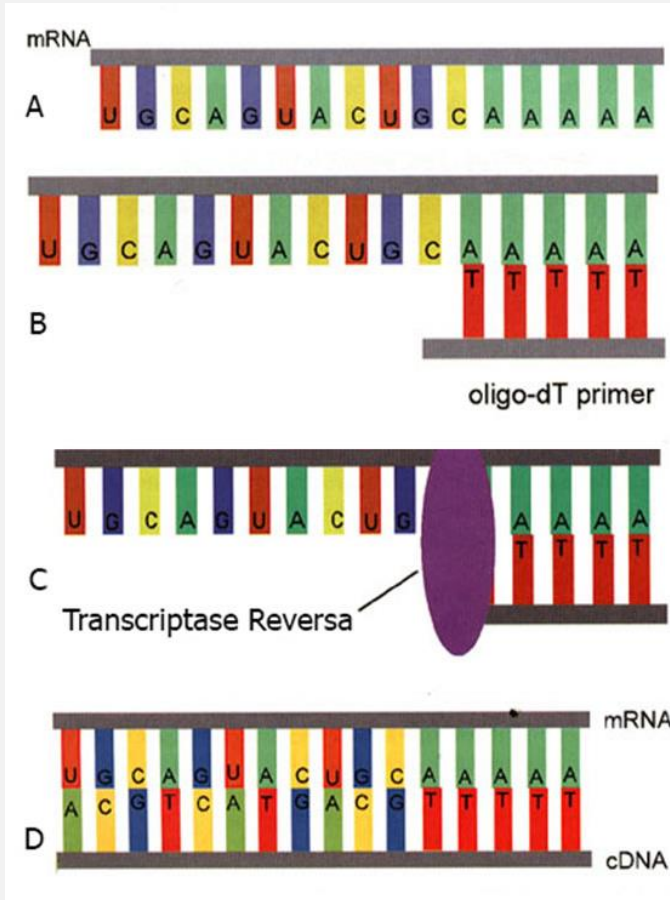
Amplificação Exponencial

O processo é repetido e a região de interesse é amplificada exponencialmente

*Amplificação = Aumento do número

RT-PCR

Reação de Polimerase em Cadeia por Transcriptase Reversa



mRNA → cDNA

Utiliza uma molécula de mRNA como molde para síntese de DNA complementar

T.cruzi diagnostic methods comparison

Table 1. Diagnostic results and performance of serological and molecular tests

| Test | Prevalence* | Test Level† | Sensitivity (95% CI) | Specificity (95% CI) | PPV (95% CI) | NPV (95% CI) | ROC area (95% CI) | $\kappa(1,0)$ | $\kappa(0,0)$ | $\kappa(0.5,0)$ | LR+ | LR- |
|-----------------|-------------|-------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------|---------------|-----------------|---------|------|
| Serological | | | | | | | | | | | | |
| In-house ELISA | 0.49 | 0.43 | 0.93 (0.86-0.97) | 1.00 (0.97-1.00) | 1.00 (0.96-1.00) | 0.94 (0.88-0.98) | 0.96 (0.93-0.99) | 0.79 | 1 | 0.88 | 9240.9 | 0.12 |
| BioELISA Chagas | 0.49 | 0.48 | 0.98 (0.93-0.99) | 1.00 (0.97-1.00) | 1.00 (0.96-1.00) | 0.98 (0.93-1.00) | 0.99 (0.98-1.00) | 0.96 | 1 | 0.98 | 10291.0 | 0.02 |
| Chagatest ELISA | 0.49 | 0.44 | 0.90 (0.82-0.95) | 1.00 (0.97-1.00) | 1.00 (0.96-1.00) | 0.91 (0.85-0.96) | 0.95 (0.92-0.98) | 0.82 | 1 | 0.90 | 9450.9 | 0.10 |
| Chagatest IHA | 0.49 | 0.36 | 0.73 (0.63-0.81) | 1.00 (0.97-1.00) | 1.00 (0.95-1.00) | 0.80 (0.72-0.86) | 0.87 (0.82-0.91) | 0.58 | 1 | 0.74 | 7665.7 | 0.27 |
| Chagas AB rapid | 0.49 | 0.43 | 0.88 (0.80-0.94) | 1.00 (0.97-1.00) | 1.00 (0.96-1.00) | 0.90 (0.83-0.95) | 0.94 (0.91-0.97) | 0.79 | 1 | 0.88 | 9240.9 | 0.12 |
| Molecular | | | | | | | | | | | | |
| PCR kDNA | 0.49 | 0.25 | 0.51 (0.41-0.61) | 1.00 (0.97-1.00) | 1.00 (0.93-1.00) | 0.68 (0.60-0.75) | 0.75 (0.71-0.80) | 0.35 | 1 | 0.52 | 5355.5 | 0.49 |
| PCR nDNA | 0.49 | 0.11 | 0.22 (0.14-0.31) | 1.00 (0.97-1.00) | 1.00 (0.85-1.00) | 0.57 (0.50-0.65) | 0.61 (0.57-0.65) | 0.13 | 0.99 | 0.22 | 2310.2 | 0.78 |

*Prevalence: total of positive diagnoses per sample. †Test level: total of positive tests per sample. Values calculated with results from each serological and molecular test according to clinical (electrocardiogram, echocardiogram and 24-h Holter and epidemiological evaluation. PPV: Positive Predictive Value, NPV: Negative Predictive Value, LR+: Positive Likelihood Ratio, LR-: Negative Likelihood Ratio, $\kappa(1,0)$: quality of sensitivity, $\kappa(0,0)$: quality of specificity, $\kappa(0.5,0)$: quality of efficiency, ROC area: Receiver Operator Characteristic curves, and 95% CI: 95% confidence interval.

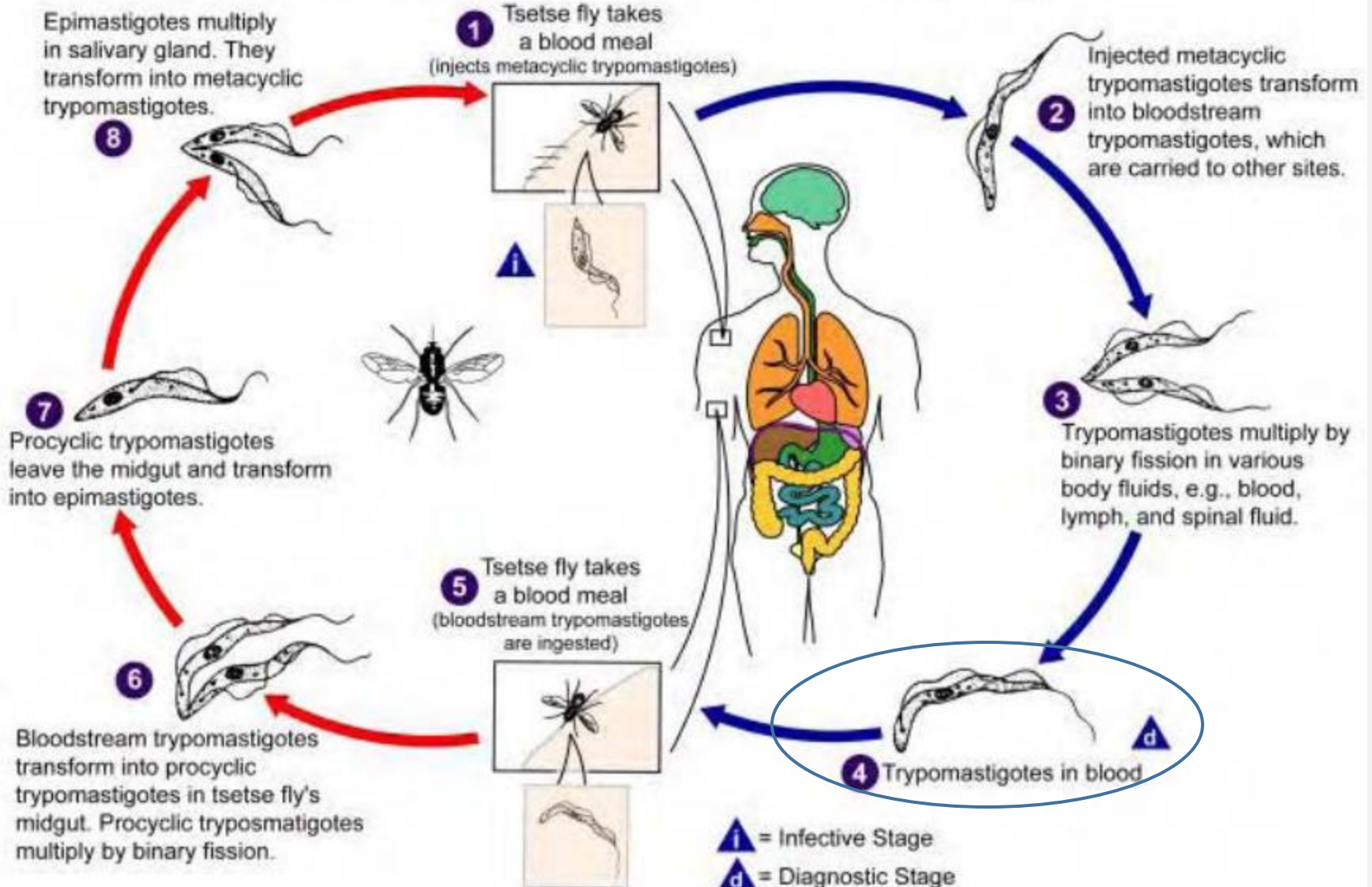
Sleeping Sickness, African (African trypanosomiasis)

(*Trypanosoma brucei gambiense*)

(*Trypanosoma brucei rhodesiense*)

Tsetse fly Stages

Human Stages



- The clinical course of human African trypanosomiasis has two stages. In the first stage, the parasite is found in the peripheral circulation, but it has not yet invaded the central nervous system. Once the parasite crosses the blood-brain barrier and infects the central nervous system, the disease enters the second stage.
- *T. b. rhodesiense* (East African sleeping sickness) is found in focal areas of eastern and southeastern Africa. Each year a few hundred cases are reported to the World Health Organization. Progresses rapidly. The parasite invades the central nervous system and eventually causes mental deterioration and other neurologic problems.
- *T. b. gambiense* (West African sleeping sickness) is found predominantly in central Africa and in limited areas of West Africa. Most of the sleeping sickness in Africa is caused by this form of the parasite. *T. b. gambiense* infection (West African sleeping sickness) progresses more slowly. Usually, after 1-2 years, there is evidence of central nervous system involvement.

Diagnostic test of *T.brucei*

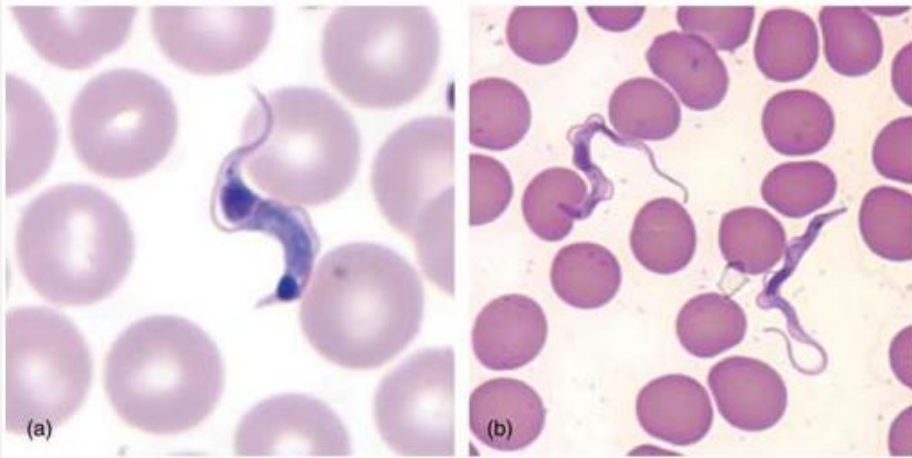
- **O exame do aspirado de nódulos linfáticos, medula óssea e baço** conduz ao diagnóstico do *T. (b) gambiense*, *T. (b) rhodesiense* e *L. donovani*.
- **O material colhido** pode ser examinado através do exame direto a fresco para a identificação das formas **tripomastigotas móveis na fase aguda** das tripanossomíases africanas.
- **Esfregaços permanentes**, fixados pelo álcool metílico e corados pelo método de Giemsa são indicados para a identificação das formas tripomastigotas.
- O material colhido pode ser **inoculado em meios de cultura**.

Diagnostic test of *T.brucei*

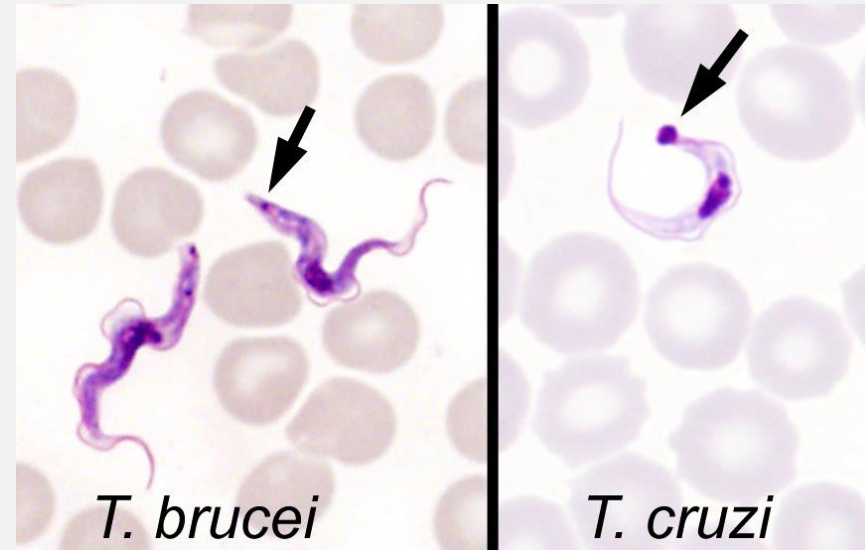
Every patient diagnosed with African trypanosomiasis must undergo a lumbar puncture for the examination of CSF. The most widely used criteria for defining second stage disease are the observation of trypanosomes in CSF or a white cell count of 6 or higher. *T. b. rhodesiense* parasites can easily be found in blood. They can also be found in lymph node fluid or in fluid or biopsy of a chancre. Serologic testing is not widely available and is not used in the diagnosis, since microscopic detection of the parasite is straightforward.

The classic method for diagnosing *T. b. gambiense* infection is by microscopic examination of lymph node aspirate, usually from a posterior cervical node. It is often difficult to detect *T. b. gambiense* in blood. Concentration techniques and serial examinations are frequently needed. Definitive diagnosis rests on microscopic observation of the parasite

Differential diagnosis of *T. brucei* and *T. cruzi*



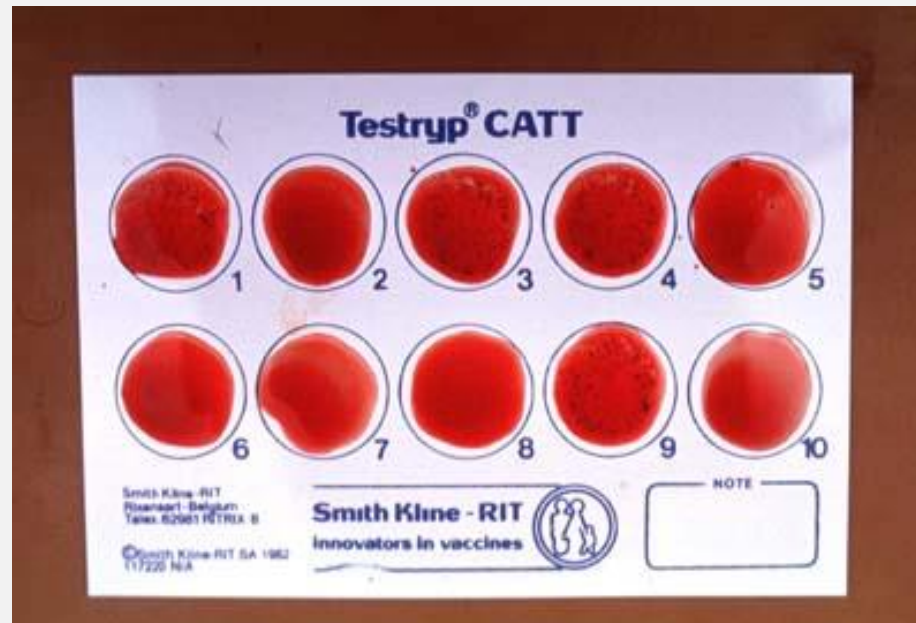
Trypanosomes (Giemsa-stained thin films; $\times 500$ magnification). (a) *T. cruzi*, (b) *T. brucei*.



Based on the blood smear morphology, a similar appearing trypanosome, *T. cruzi*, should also be considered in the differential. *T. cruzi* is found in South and Central America and causes American trypanosomiasis (a.k.a. Chagas disease). The most reliable method for differentiating the trypomastigotes (motile blood stage forms) of *T. brucei* and *T. cruzi* is by the size of the kinetoplast (see below, arrows). *T. brucei* has a relatively small kinetoplast, while *T. cruzi* has a larger kinetoplast. *T. cruzi* trypomastigotes also commonly form a "C" shape, although this is a less reliable feature. Finally, *T. cruzi* may also be found as a non-motile amastigote form in various tissues, while *T. brucei* is only found in the trypomastigote form in humans.

Detecting trypanosomes in *T. b. gambiense* infection is more difficult. **The card agglutination test** for trypanosomiasis/*T. b. gambiense* is a serologic screening test used for mass population screening in endemic areas of Africa.

For parasitologic confirmation, a posterior cervical lymph node (if present) is punctured and the fluid examined. Trypanosomes can also be found in blood, however, the yield is low, and concentration techniques (e.g. buffy coat examination, miniature anion-exchange centrifugation technique) are helpful.



Rapid Diagnostic Test

Figure 1.4.1b

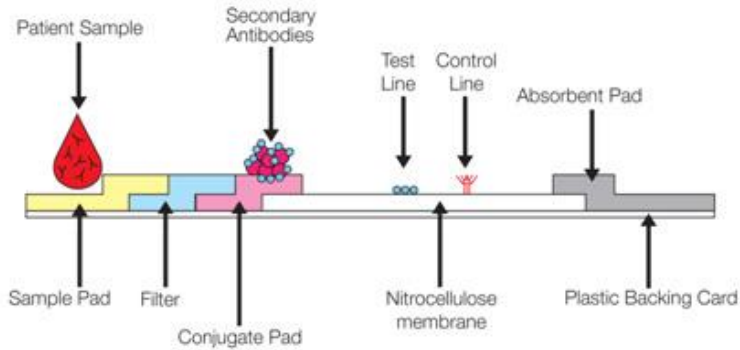


Figure 1.4.1b

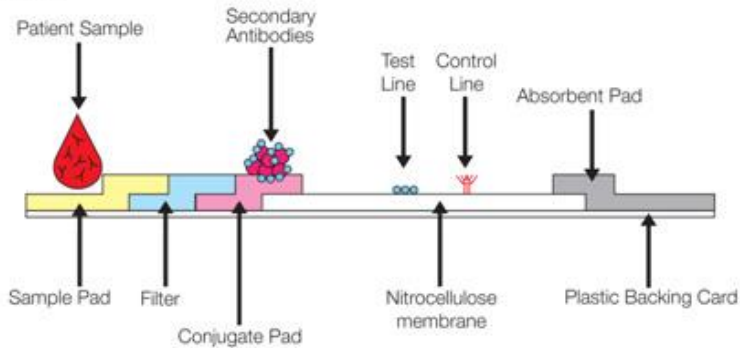


Figure 1.4.1d

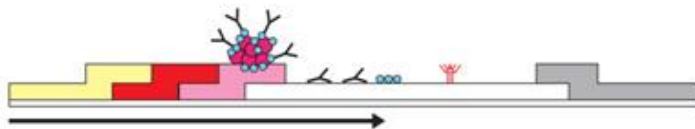


Figure 1.4.1e

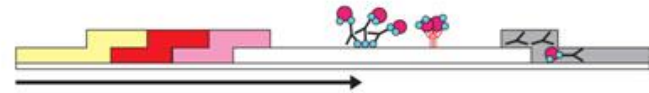
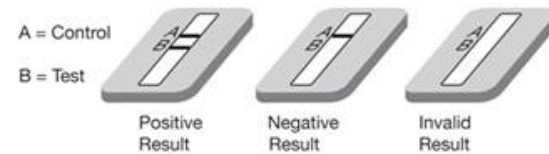
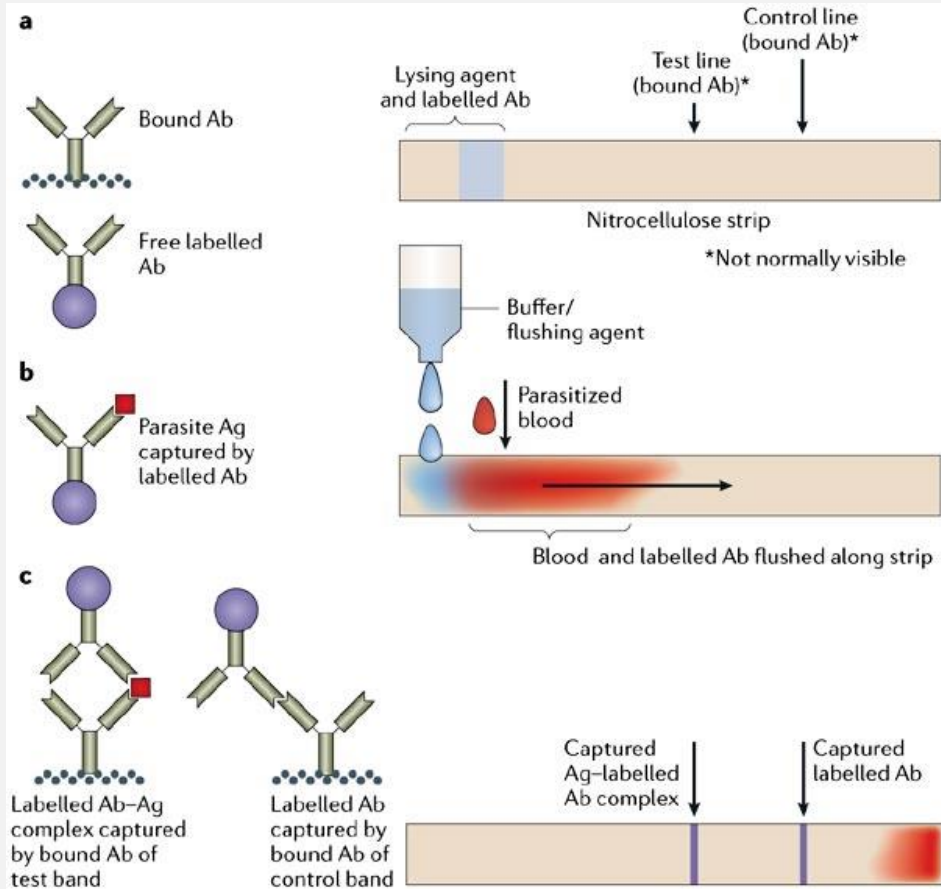


Figure 1.4.1h



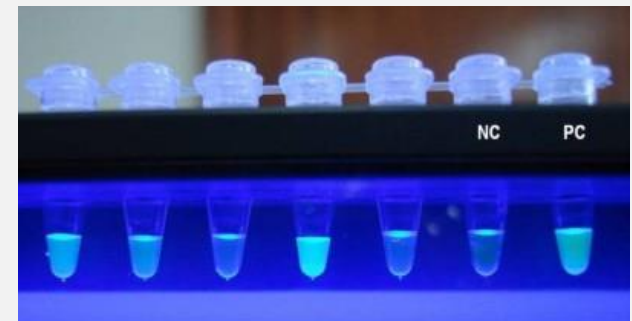
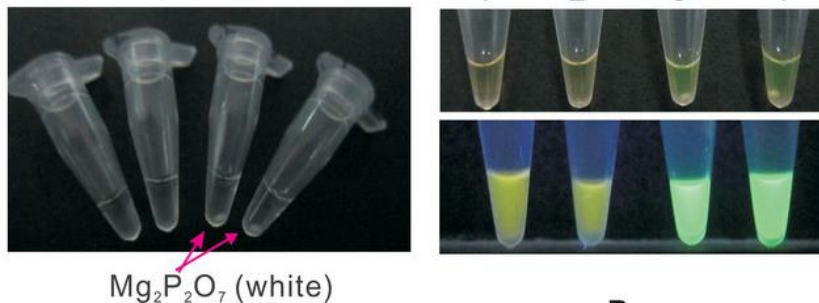
Show video

Rapid Detection Test

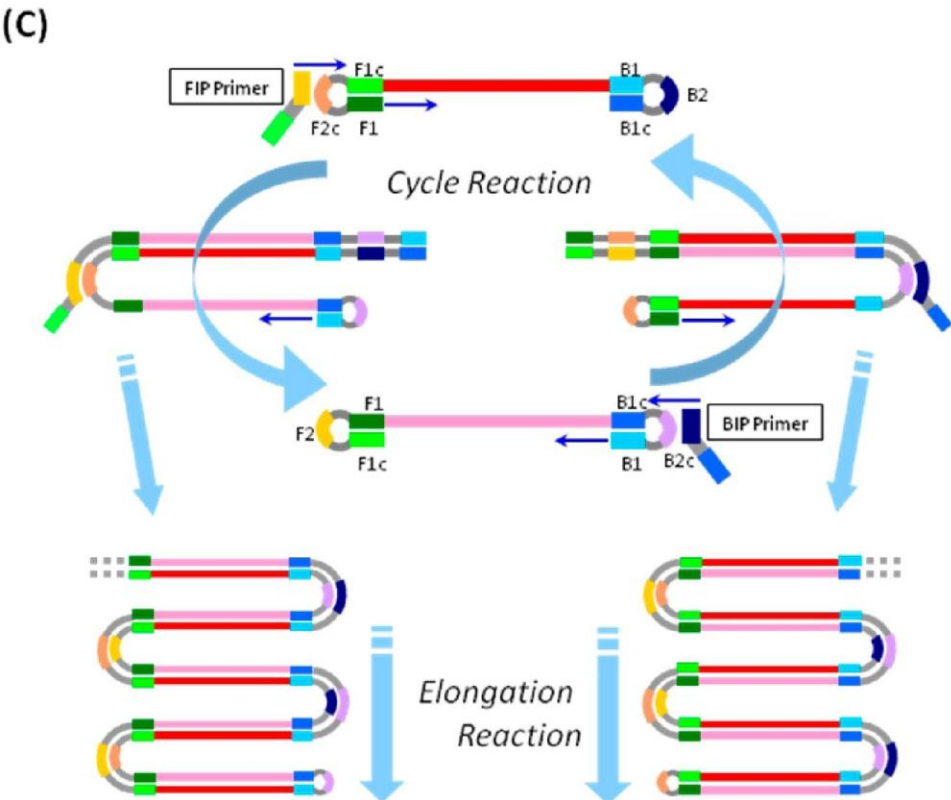
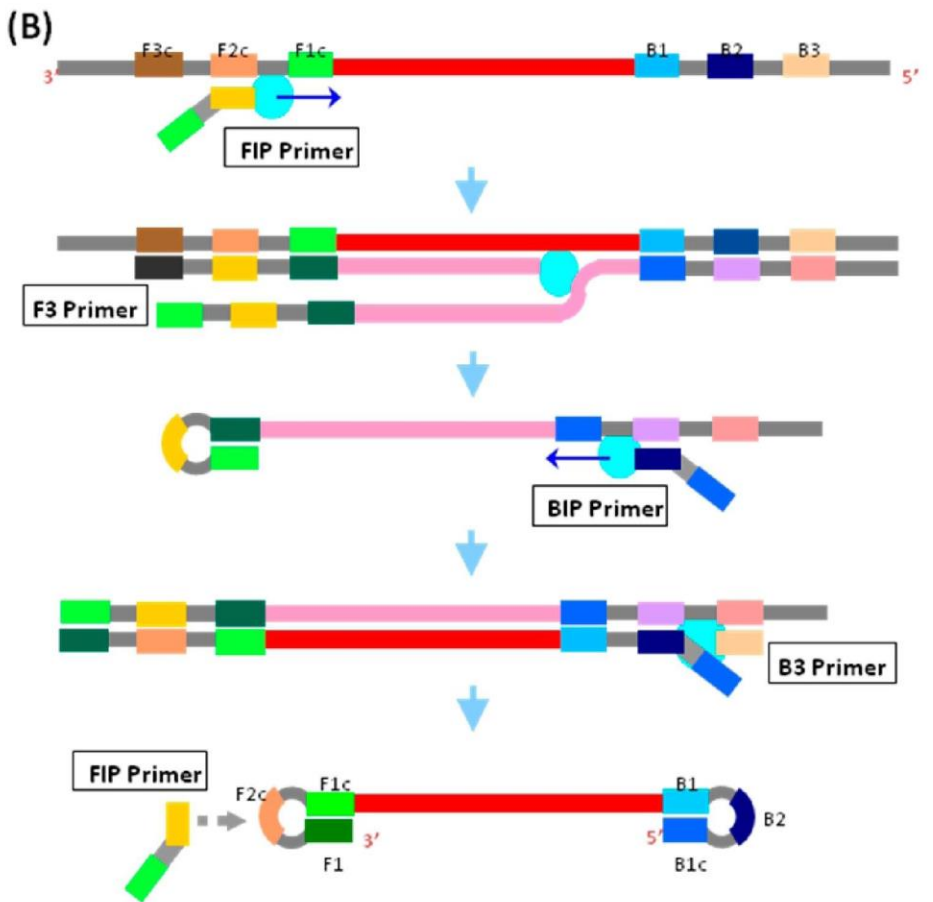
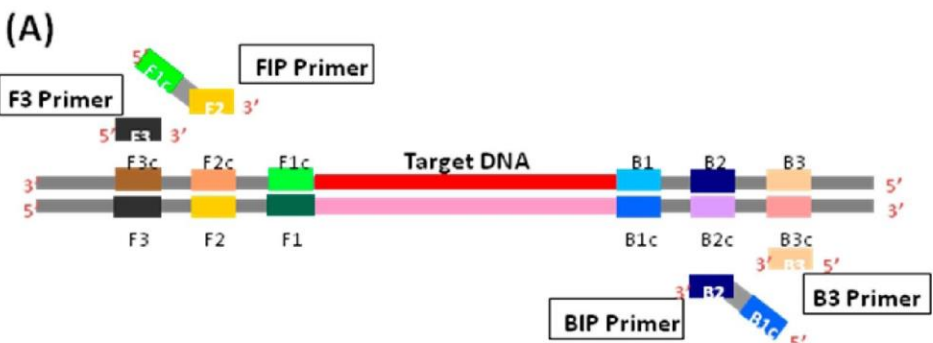


LAMP - Loop Mediated Isothermal Amplification

Current serologic tests have inadequate specificity and require confirmation by other methods. Detection of trypanosomal DNA sequences from a patient's blood, urine or saliva could be a significant improvement on parasitological examination. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of DNA is a promising molecular technique that shows high sensitivity and specificity. The test amplifies target DNA at a constant temperature, meaning that it can be carried out with minimal equipment at low-level laboratories such as the ones in HAT endemic countries. Furthermore, positive samples are identified visually either through the formation of a white precipitate, a colour change or fluorescence. LAMP can also be used for the simultaneous analysis of large numbers of samples, and can be performed by staff with minimal experience in molecular biology.



Lamp steps



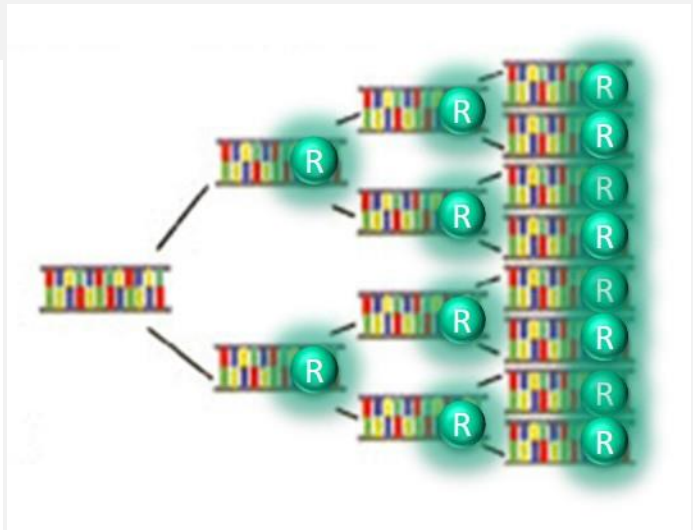
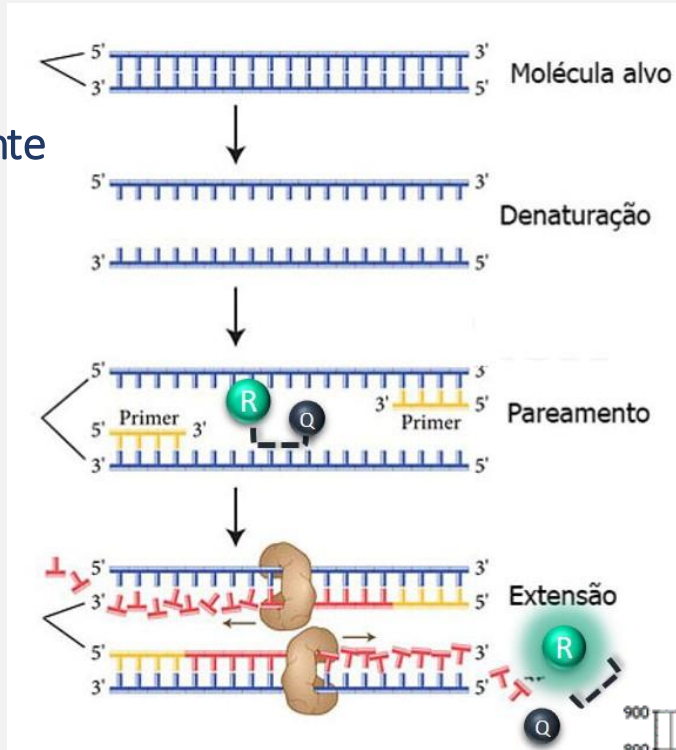
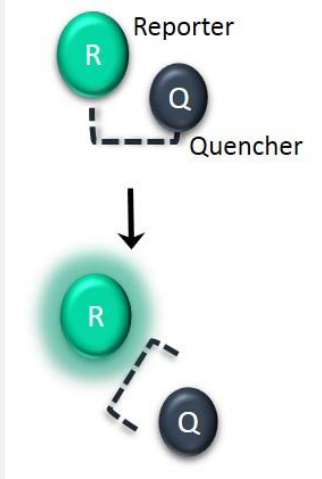
Comparison of a real-time RT-LAMP and RT-PCR system

| real-time RT-LAMP | RT-PCR | Nested RT-PCR |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • High sensitivity (100 fg of total RNA) • Rapid (1 h) • Cheap instrument <ul style="list-style-type: none"> ➢ Turbidimeter • User friendly <ul style="list-style-type: none"> ➢ Read the result by real-time system | <ul style="list-style-type: none"> • Lower sensitivity (100 pg of total RNA) • Long time (3 h) • PCR machine • Carcinogen <ul style="list-style-type: none"> ➢ Gel Electro.(EtBr) | <ul style="list-style-type: none"> • High sensitivity (100 fg of total RNA) • Very long time (4-5 h) • PCR machine • Carcinogen <ul style="list-style-type: none"> ➢ Gel Electro.(EtBr) |

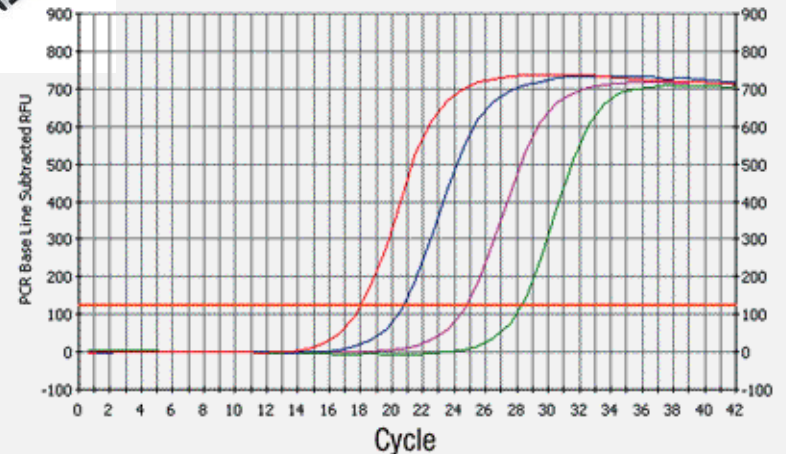
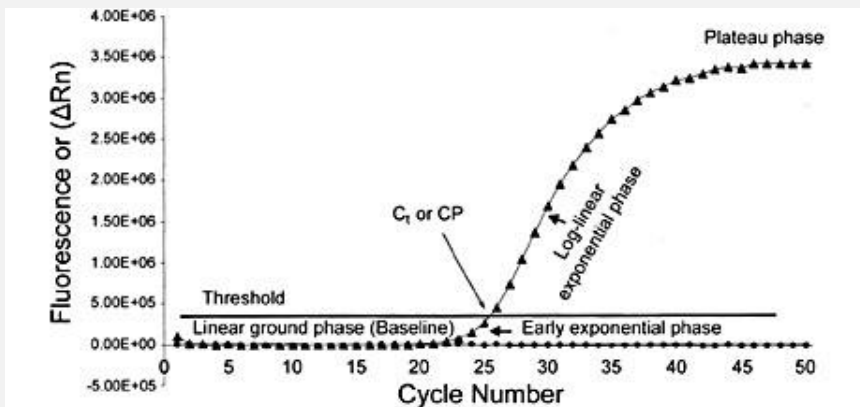
Although the LAMP technique is an improvement over conventional PCR, it is still not well positioned compared to RDTs when considering field conditions.

PCR Quantitativo

Sonda com reporter Fluorescente



Quantidade de material inicial é proporcional a fluorescência detectada



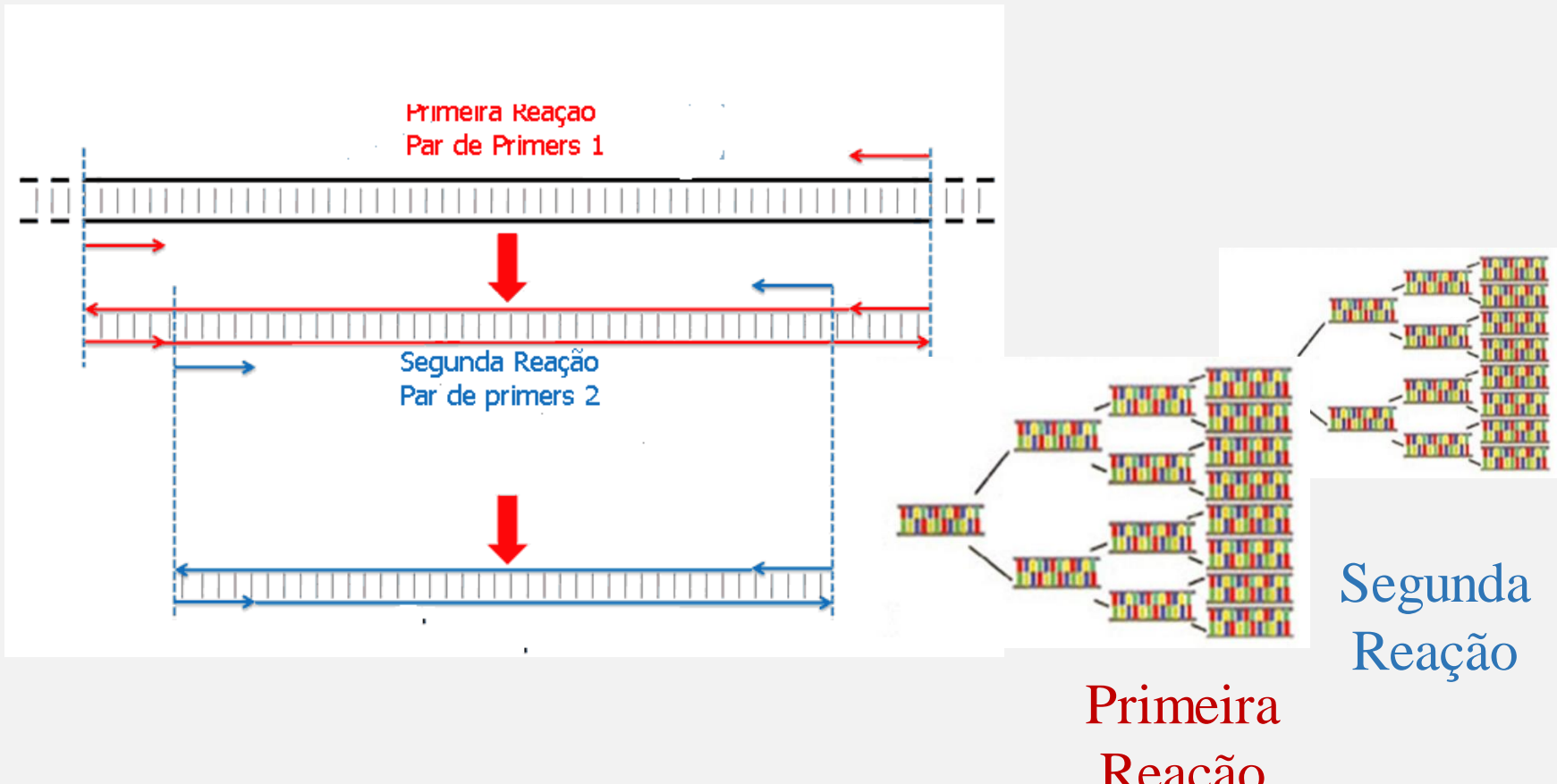
Red=10,000 cells
Blue=1000 cells
Pink=100 cells
Green=10 cells

Nested PCR

Alternativa para pequena quantidade de amostra inicial

Reduz a possibilidade de falso positivo (+específico)

- ✓ **2 pares de Primers/Iniciadores**
- ✓ Oligonucleotídeos
- ✓ Enzima polimerase



Diagnostic methods characteristics for Human African Trypanosomiasis

| | Affordable (Euro) | Sensitivity (%) | Specificity (%) | User-friendly(minutes) | Rapid | Robust | Equipment-free | Deliverable |
|--------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|--------------|---------------|-----------------------|--------------------|
| Tests | | | | | | | | |
| CATT | 0.46 | 68.8–100 | 83.5–99.3 | Yes | <30 | No | Yes | Yes |
| CATT dilution | 1 | 78.8 | 58.5–99.5 | No | <30 | No | No | Yes |
| MicroCATT | 0.8 | 91–92.7 | 93.7–100 | No | <30 | No | No | Yes |
| CATT-D10 | 1.5–2 | NR | NR | Yes | <30 | Yes | Yes | Yes |
| Latex | 0.8 | 67.9–100 | 96.1–99.2 | No | <30 | No | No | Yes |
| IFAT | 5–7 | 75.6–99.2 | 99.4–100 | No | >120 | No | No | No |
| ELISA | 0.62 | 96.3–100 | 94.7–100 | No | >120 | No | No | No |
| Immune trypanolysis test | >5 | 97.2–100 | 100 | No | >120 | No | No | No |
| WBF | 0.21 | 3.9–54.2 | 1† | Yes | 16 | n.a | Yes | No |
| TBF | 0.54 | 25.9–100 | 1† | Yes | 47 | Yes | Yes | No |
| LNA | 0.19 | 18.8–63.6 | 1† | Yes | 16 | n.a | Yes | No |
| mHCT | 0.76 | 44.3–93.0 | 1† | No | 18 | Yes | No | No |
| QBC | 3 | 100 | 1† | No | <30 | Yes | No | Yes |
| mAECT | 3 | 75.3–90.9 | 1† | No | ~30 | Yes | No | Yes |
| mAECT-bc | 3 | 96.5 | 1† | No | >30 | Yes | No | Yes |
| PCR | 2.6–4.8 | 70.0–100 | 71.4–100 | No | 120–240 | No | No | No |
| PCR-OC | 2.6–4.8 | 82.4–100 | 99.2–100 | No | 120–240 | No | No | No |
| NASBA | 5.20 | 70.0 | 100 | No | 120 | No | No | No |
| NASBA-OC | 4.0–4.5 | 73.0–97.1 | 99.2–100 | No | 90 | No | No | No |
| LAMP | 5 | 75.0 | 100 | No | 30–60 | No | No | No |

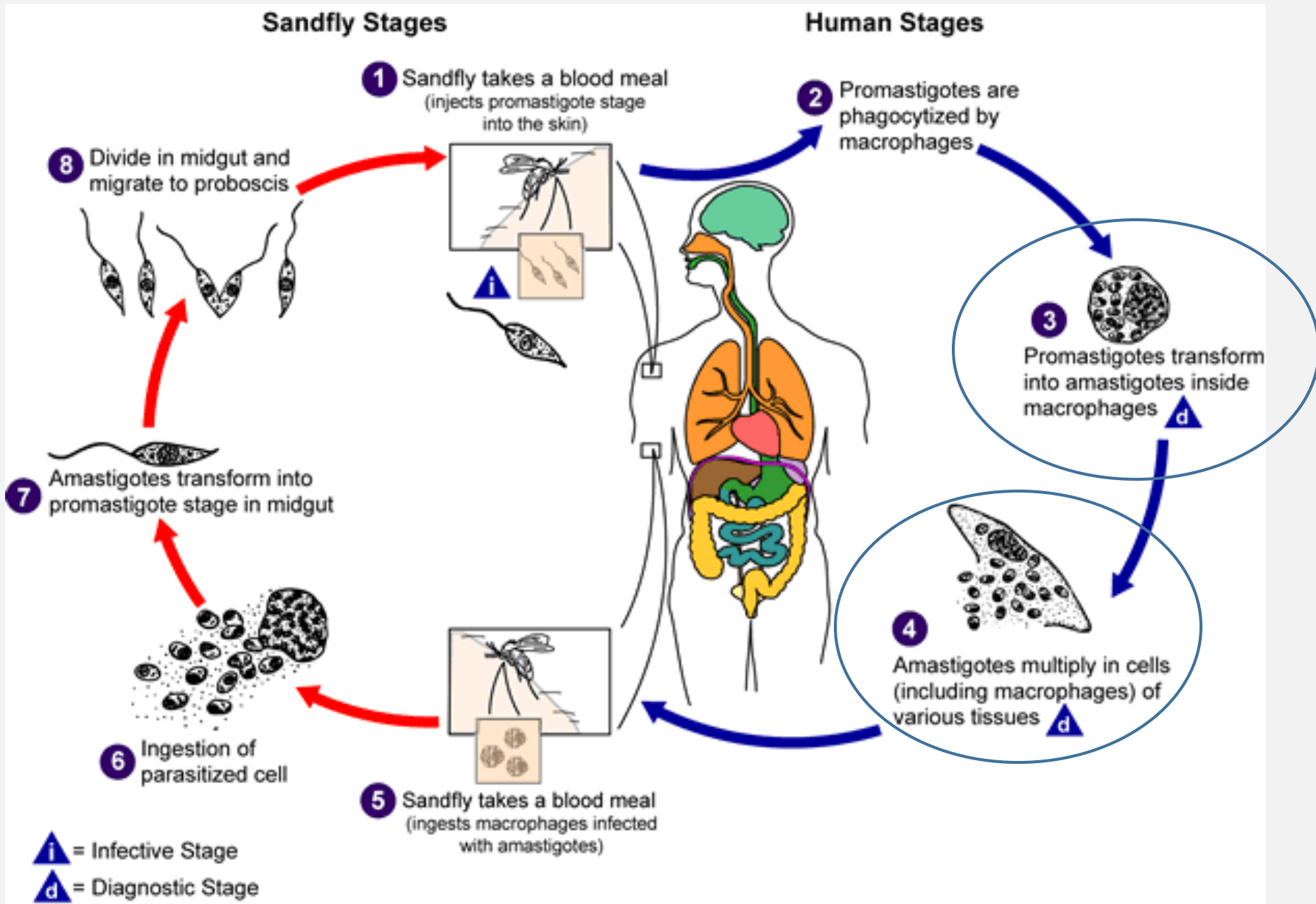
1† = specificity of these techniques is assumed to be 100%.

doi:10.1371/journal.pntd.0001919.t001

T. brucei treatment

| Species | Drug of choice | Adult Dosage | Pediatric Dosage |
|--|---------------------------|--|--|
| <i>T. b. rhodesiense</i> , hemolymphatic stage | Suramin ¹ | 1 gm IV on days 1,3,5,14, and 21 ² | 20 mg/kg IV on days 1, 3, 5, 14, and 21 ³ |
| <i>T. b. rhodesiense</i> , CNS involvement | Melarsoprol ⁴ | 2-3.6 mg/kg/day IV x 3 days. ⁵ After 7 days, 3.6 mg/kg/day x 3 days. Give a 3rd series of 3.6 mg/kg/d after 7 days. | 2-3.6 mg/kg/day IV x 3 days. ⁵ After 7 days, 3.6 mg/kg/day x 3 days. Give a 3rd series of 3.6 mg/kg/d after 7 days. |
| <i>T. b. gambiense</i> , Hemolymphatic stage | Pentamidine ⁶ | 4 mg/kg/day IM or IV x 7-10 days | 4 mg/kg/day IM or IV x 7-10 days |
| <i>T. b. gambiense</i> , CNS involvement | Eflornithine ⁷ | 400 mg/kg/day in 4 doses x 14 days | 400 mg/kg/day in 4 doses x 14 days |

Leishmania



Leishmania

As leishmanioses são infecções parasitárias que ocorrem em inúmeras espécies animais, incluindo o homem, sendo causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*.

A doença humana apresenta um largo espectro de manifestações clínicas que incluem formas tegumentares, mucocutâneas, e viscerais.

Em particular pode ser dividida em: Leishmaniose cutânea localizada, Leishmaniose cutânea difusa, Leishmaniose cutâneo-mucosa e Leishmaniose visceral.

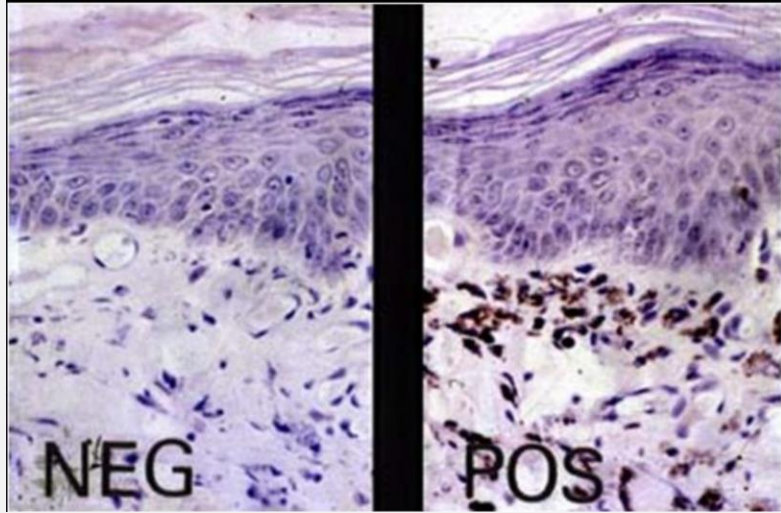
As formas tegumentares e mucocutâneas raramente levam à morte, a leishmaniose visceral, quando não tratada, ocasiona elevadas taxas de mortalidade
agentes etiológicos mais frequentemente isolados de casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) em humanos são *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana* e *L. peruviana*.

Diagnostico

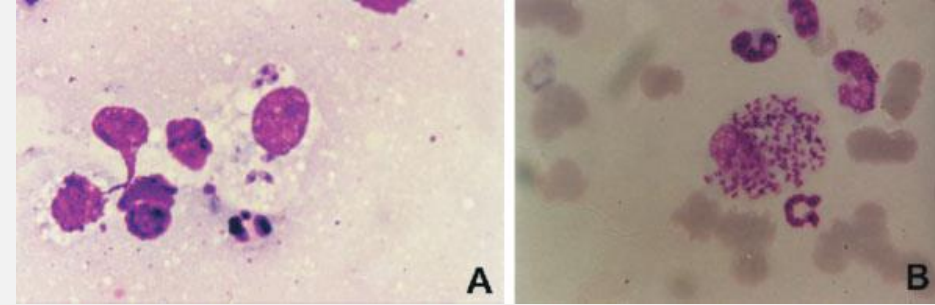
1- Identificação de amastigotas do parasita:

- **LC – biópsia ou raspado de lesão de pele** (Em caso de múltiplas lesões, recomenda-se fortemente que a obtenção de material seja realizada em lesões mais recentes, uma vez que estas se apresentam mais ricas em parasitos.)
- **LV - aspirado de medula óssea**, baço, fígado ou linfonodos.
- **pesquisa direta** – ainda o mais utilizado, fatores influenciam sensibilidade.
- **cultura (meio NNN/LIT)** – 5 dias a 4 semanas para o diagnóstico (A cultura de Leishmania pode ser realizada a partir do fragmento de tecido retirado na biópsia da borda da lesão, que é semeado em meio LIT (Liver Infusion Tryptose), NNN (ágar-sangue)+ LIT ou Schneider.)
- **inoculação de animais** – não é muito útil para dx de rotina, 1-3m (O hamster (Mesocricetus auratus) é o animal mais utilizado devido a sua grande suscetibilidade ao parasito.)

Microscopy of Leishmania



O fragmento de tecido pode ser processado através de técnicas histológicas convencionais, podendo o material ser corado pela Hematoxilina-Eosina (HE), Giemsa ou Grocott.



A) Esfregaço por aposição de biópsia de lesão demonstrando formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* sp. em macrófagos; B) Formas amastigotas de *Leishmania chagasi* em célula mononuclear de medula óssea. Esfregaços corados pelo método de Giemsa. Aumento: 1.000X.

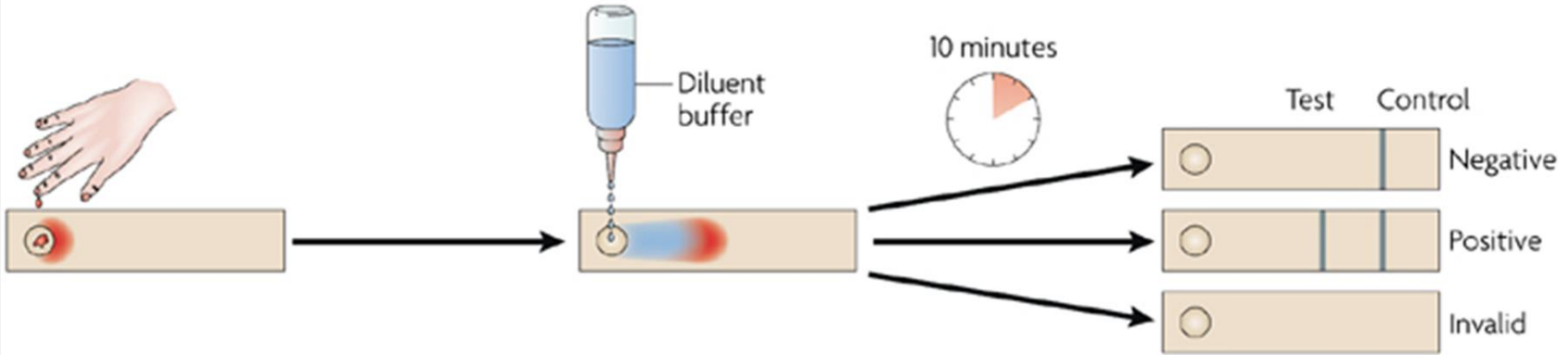
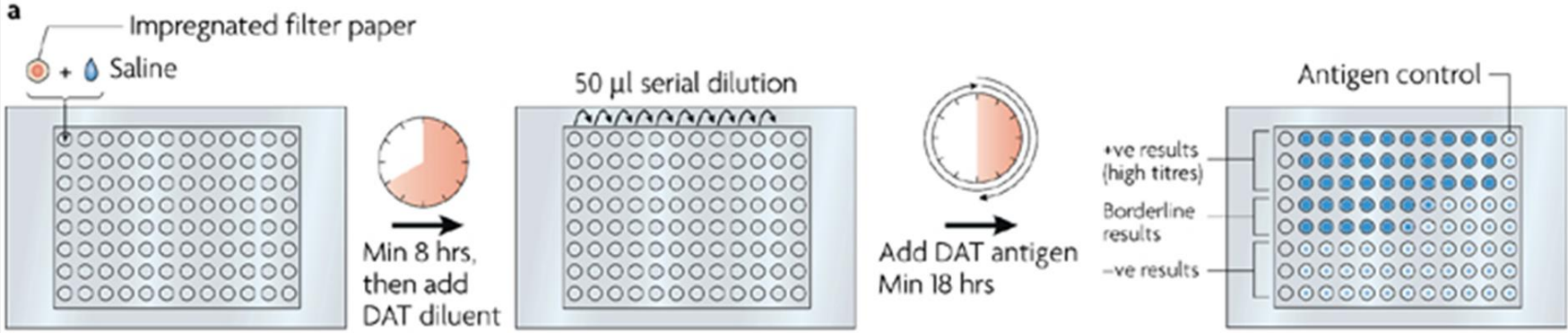
Imunodiagnóstico

- **Reação de Montenegro (ainda muito útil para LC):** Este teste avalia a reação de hipersensibilidade retardada do paciente frente a antígenos de *Leishmania* sp. 0,1ml do antígeno é injetado intradermicamente na face anterior do antebraço. A leitura é realizada 48 a 72 horas após a inoculação, medindo-se o diâmetro do halo de endurecimento com o auxílio de uma caneta esferográfica.



- **Sorologia (imunofluorescência indireta ou ELISA):** testes sorológicos podem ser utilizados para detectar anticorpos da classe IgM e IgG anti-*Leishmania*. Elevadas especificidade e sensibilidade têm sido demonstradas no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral utilizando-se antígenos recombinantes.

Direct agglutination test (DAT) and the rK39-based immunochromatographic test (ICT)

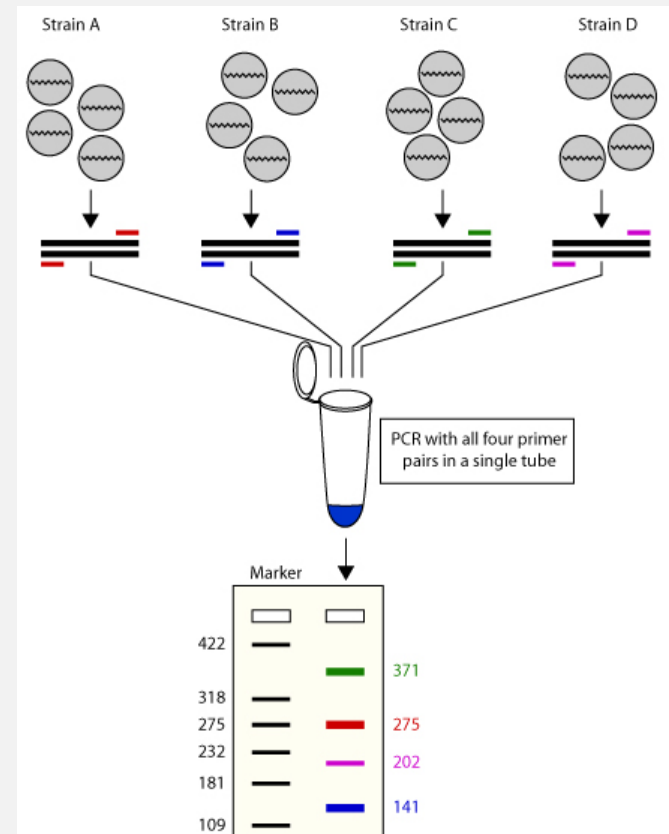


Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Utilizando-se o DNA extraído de biópsias de lesões, o método é capaz de detectar a presença do DNA de *Leishmania* spp., mesmo quando não são observadas formas amastigotas do parasito ao exame microscópico.

Seqüências podemos citar os minicírculos de kDNA, cuja abundância e conservação constituem-se como importantes pré-requisitos.

A **multiplex PCR** utiliza diferentes pares de iniciadores em uma mesma reação, permitindo o diagnóstico através da detecção do DNA do parasito, assim como a caracterização específica dos parasitos através do padrão distinto de migração eletroforética dos produtos de amplificação gerados com os diferentes pares de iniciadores.

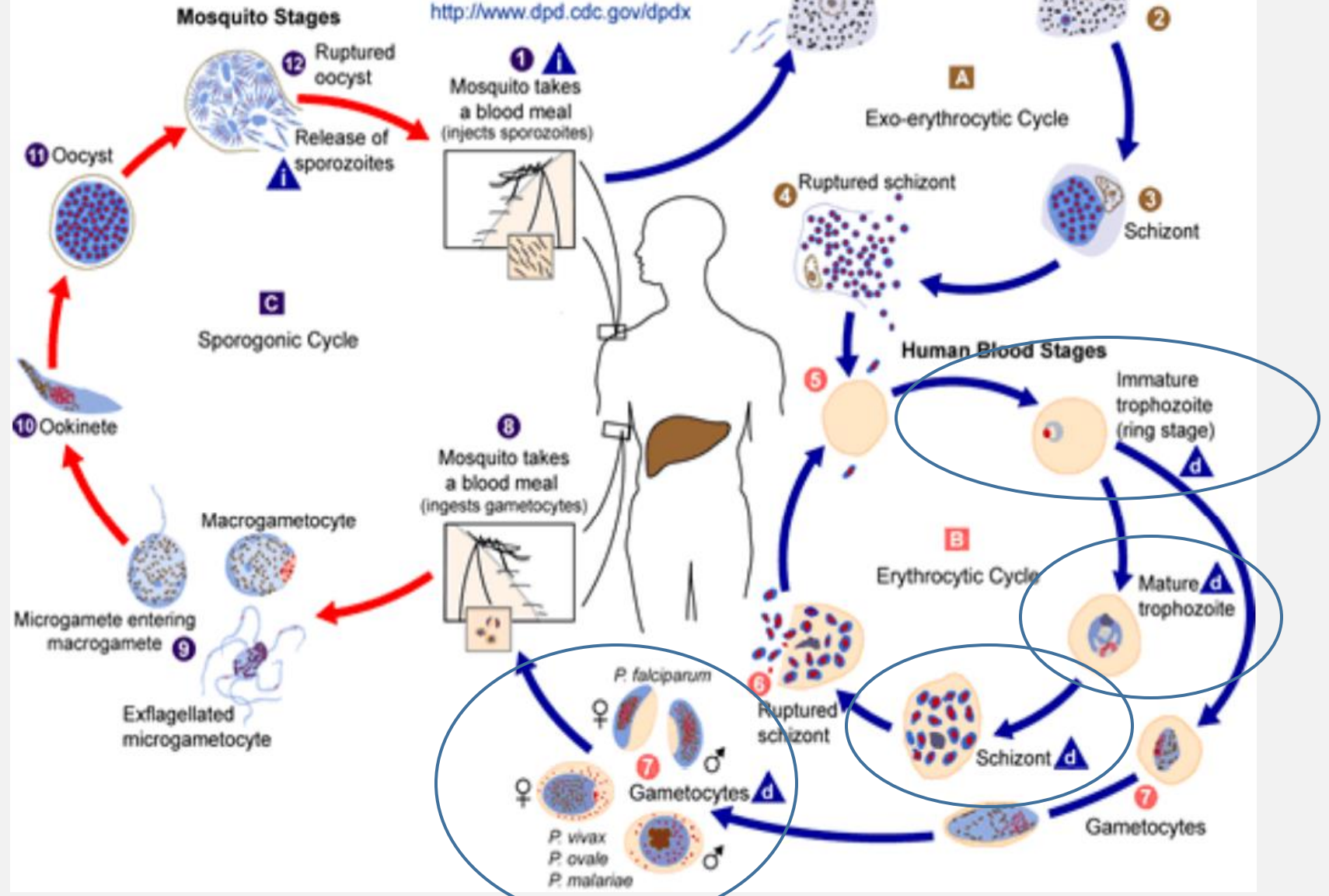


i = Infective Stage
d = Diagnostic Stage

Plasmodium



<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>



(SOURCE: PHIL 3384 – CDC/Alexander J. da Silva, PhD/Melanie Moser)

Malária

Agentes etiológicos protozoários do gênero Plasmodium (Mais comuns são *P falciparum*, *P vivax* e *P malarie*)

Transmitida por mosquitos do gênero Anopheles

Sintomas mais comuns:

Febre

Anemia

Esplenomegalia

Diagnóstico

Material coletado

- Sangue

Diagnóstico Laboratorial

Pesquisa por Microscopia

Métodos de coloração - Coloração de Giemsa

Diagnóstico imunológico

Pesquisa por Imunofluorescência

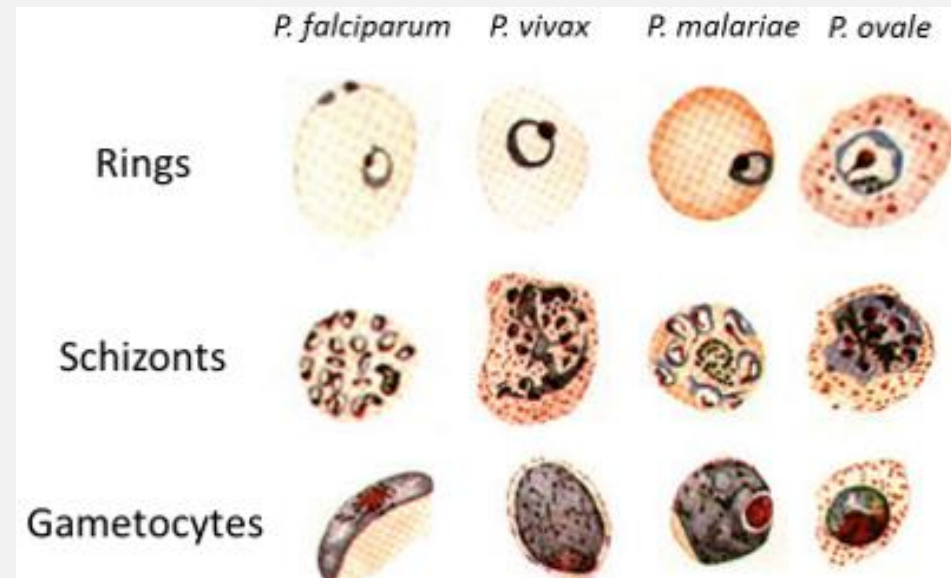
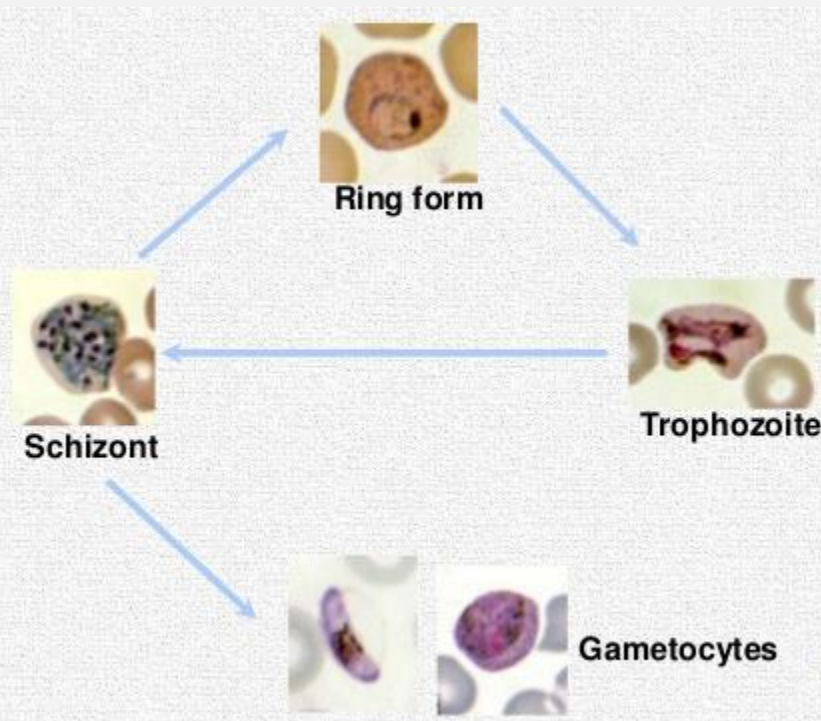
A detecção de anticorpos por sorologia não diferencia infecção aguda de passada.

Diagnóstico Molecular

Pesquisa por PCR - são utilizados em pesquisa, mas não têm papel na rotina diagnóstica.

Microscopia

- O diagnóstico de “certeza” da malária só é possível pela **demonstração do parasito, ou de antígenos relacionados, no sangue periférico do paciente;**
- Visualização do parasito através de microscopia óptica, após coloração com corante vital (azul-de-metileno) e pelo método de Giemsa. Esses são os únicos métodos que permitem a diferenciação específica dos parasitos, a partir da análise da sua morfologia e das alterações provocadas no eritrócito infectado.



Diagnostic keys for plasmodia (Giemsa stained blood films)

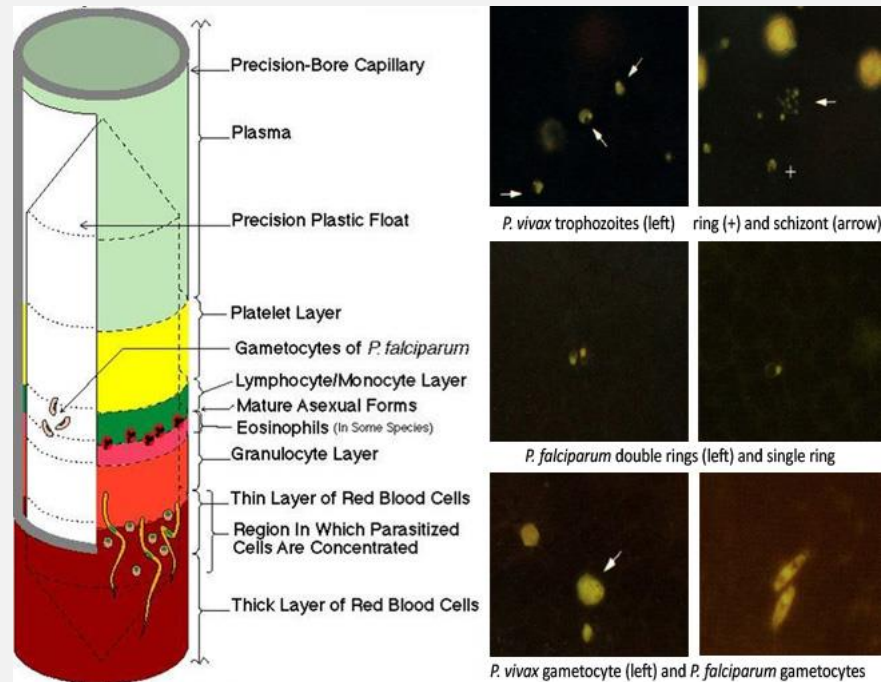
| | Question/Answers | Go to | Parasite |
|----|---|-------|--|
| 1 | Which shape does the parasite have? | | |
| 1a | Ring form with 1 nucleus | 6 | |
| 1b | Ring form with 2 nuclei, delicate ring, sometimes accollé; often multiple rings per cell | | <i>P. falciparum</i> (multiple rings) |
| 1c | Parasite almost as big as erythrocyte with only 1 nucleus (amoeboid trophozoite or gametocyte) | 2 | |
| 1d | Parasite as big as erythrocyte with more than 1 nucleus (schizont) | 7 | |
| 1e | Parasite is "banana-shaped" (micro- or macrogametocyte) | | <i>P. falciparum</i> (gametocyte) |
| 2 | Are vacuoles visible in the parasite? | | |
| 2a | The parasite has no vacuoles (gametocyte) | 3 | |
| 2b | The parasite contains one or several small vacuoles (mature trophozoite) | 5 | |
| 3 | What is the shape of the parasite? | | |
| 3a | Gametocyte is "banana-shaped" (Macrogametocyte: blue cytoplasm, elongated, chromatin mass concentrated in the middle Microgametocyte: more stumpy, cytoplasm more redish, chromatin mass diffuse) | | <i>P. falciparum</i> (gametocyte) |
| 3b | Gametocyte is round or oval | 4 | |

QBC® (*QUANTITATIVE BUFFY COAT*)

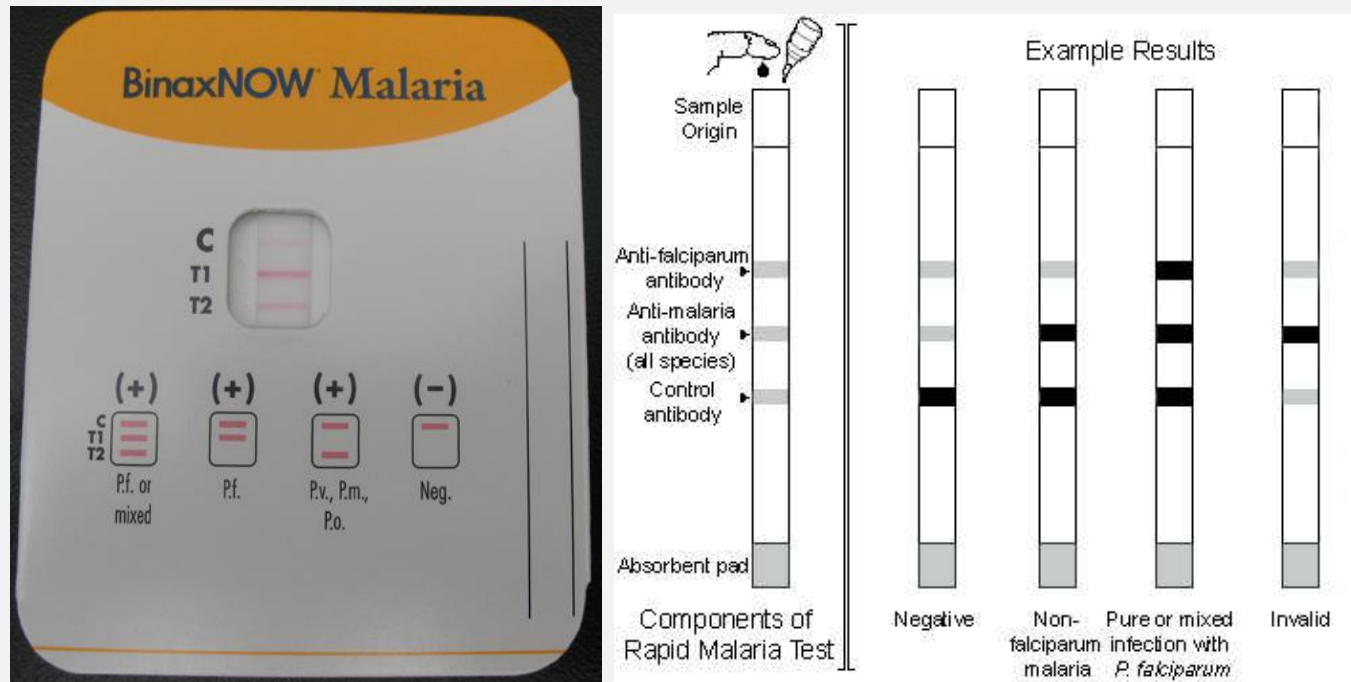
Técnica que combina a concentração dos parasitos pela centrifugação do sangue em tubos de micro-hematócrito e a coloração de seus ácidos nucleicos (DNA e RNA) pelo fluorocromo alaranjado de acridina.

É um teste rápido, sensível e específico, não necessitando de profissional altamente qualificado para sua interpretação.

Trata-se de técnica de alto custo financeiro, já que envolve microscopia fluorescente e tubos previamente preparados com anticoagulante e corantes especiais.



Rapid diagnostic tests for Malaria



Captura qualitativa de um antígeno do *P. falciparum*, a proteína 2, rica em histidina (PfHRP2), conhecida comercialmente como ParaSight-F® (Becton & Dickinson) e ICT Malaria Pf® (ICT Diagnostics). Fitas de papel de nitrocelulose contendo anticorpo monoclonal específico contra peptídeos da PfHRP2 são a base do teste.

PROTOZOÁRIOS INTESTINAIS

- Os protozoários parasitos do intestino humano pertencem a cinco grupos: amebas, flagelados, ciliados, coccídios e microsporídios. Com exceção de alguns microsporídios, a totalidade dos organismos vive no trato intestinal.
- O homem se infecta ao **ingerir cistos, oocistos ou esporos, presentes nos alimentos e na água contaminada com fezes**, ou bradizoítos encontrados na carne de bovinos ou de suínos infectada com sarcocistos maduros ou pelo contato boca-a-boca (*Entamoeba gingivalis*).
- A maioria dos parasitos intestinais é diagnosticada pelo **exame das fezes, embora outros materiais**, como urina, escarro, secreções urogenitais, aspirados, tecidos, conteúdo duodenal e espécimes obtidos por biópsia, possam ser utilizados para a identificação de certas espécies.

Amostra Fecal (considerações gerais)

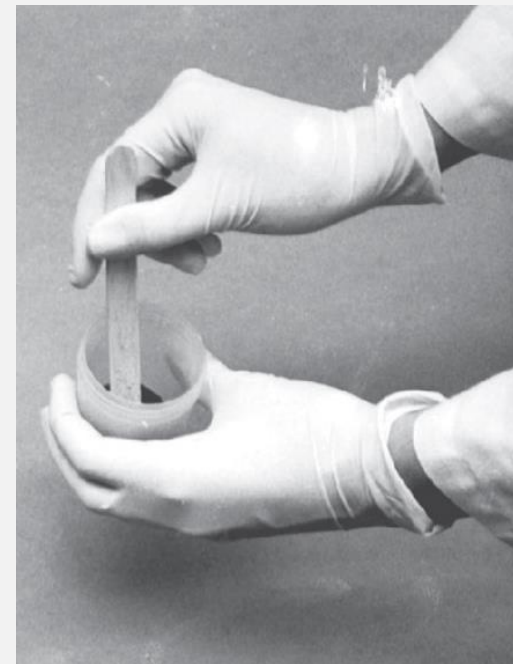
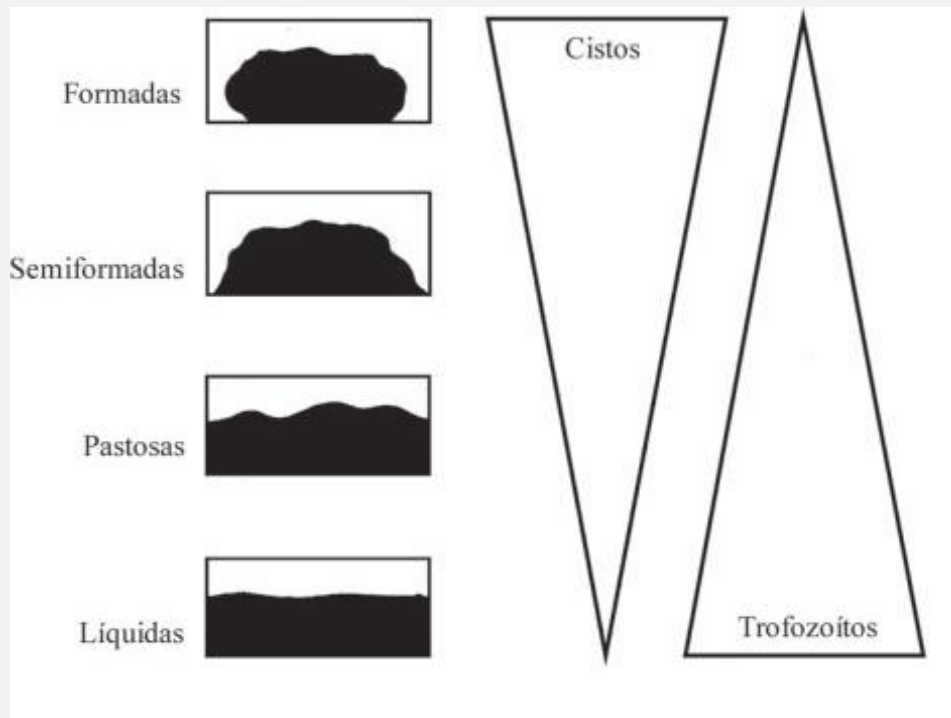
- A maioria dos parasitos intestinais é diagnosticada pelo exame das **fezes**;
- Os estágios usuais de diagnóstico são os **ovos e as larvas de helmintos e os trofozoítos, cistos, oocistos e esporos de protozoários**.
- Um material fecal **inadequadamente colhido, velho ou mal preservado** será de pequeno valor para o diagnóstico.
- O recipiente deve ter características especiais;
- A possibilidade de encontrar organismos aumenta pelo exame de **amostras múltiplas**, a emissão dos estágios de diagnóstico varia com as diferentes espécies de parasitos
- **O tempo de colheita** das amostras fecais influi de maneira direta na identificação dos parasitos. Desde que os trofozoítos de protozoários não se multiplicam ou se encistam fora do corpo humano, eles morrem e se degeneram após a excreção das fezes.
- Necessidade de preservar as amostras.

Amostra Fecal (considerações gerais)

Exame macroscopico

O espécime fresco oferece a oportunidade de exame e de avaliação macroscópica de todo o bolo fecal, enquanto o material preservado fornece somente informações do material submetido ao exame parasitológico.

As amostras fecais não preservadas devem ser examinadas macroscopicamente para determinar a consistência, o odor, a cor, a presença ou a ausência de sangue, de muco, de proglotes e de vermes adultos ou outras condições anormais.

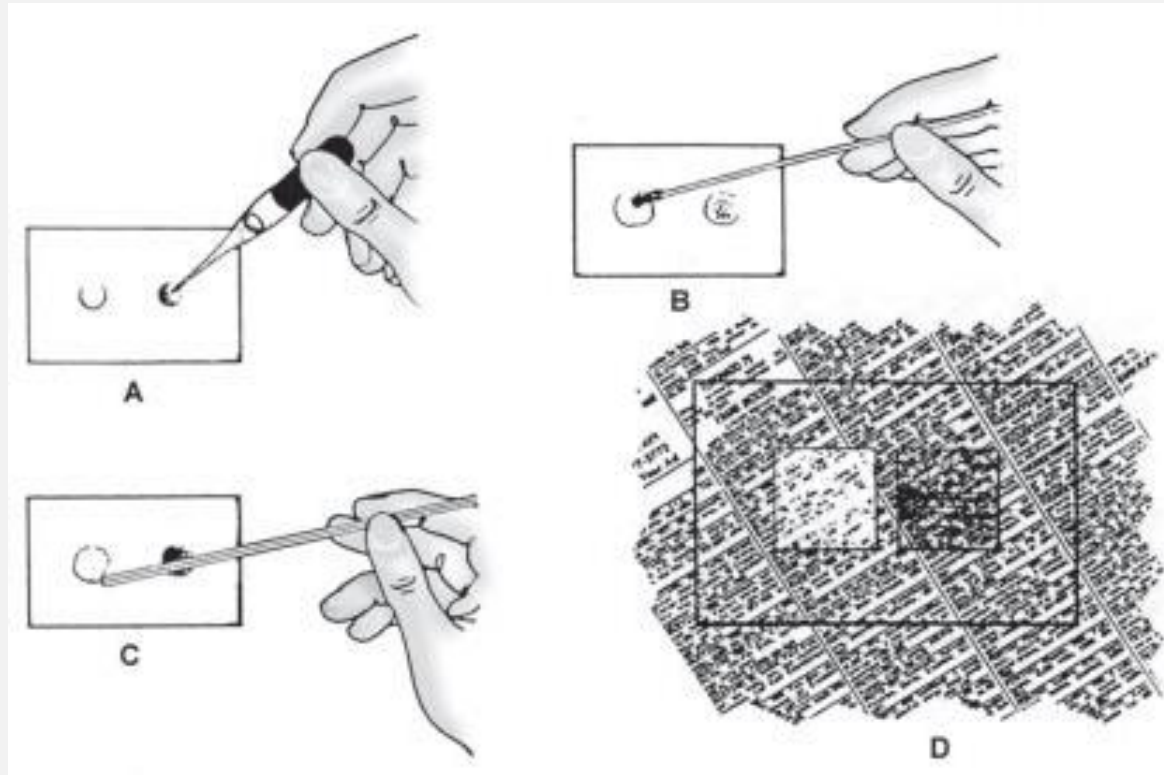


Amostra Fecal (considerações gerais)

Exame microscopico

- **O exame de esfregaços a fresco pelos métodos diretos é o método mais fácil e,** talvez, o mais usado na rotina do laboratório, permitindo visualizar os estágios de diagnóstico dos protozoários (trofozoítos, cistos, oocistos e esporos) e dos helmintos (ovos, larvas e pequenos adultos).
- O simples exame microscópico é, em muitos casos, suficiente para o diagnóstico mas outras técnicas pode ser associadas pela preparação das amostras como concentração;
- Pelos **processos mecânicos**, os elementos são **concentrados por meio da centrifugação**, baseados nas propriedades físicas, como a densidade dos ovos e cistos, aderência ao vidro etc. Nos **processos biológicos**, os parasitos são **concentrados** ativamente de acordo com seu tropismo (hidrotropismo, termotropismo e fototropismo).

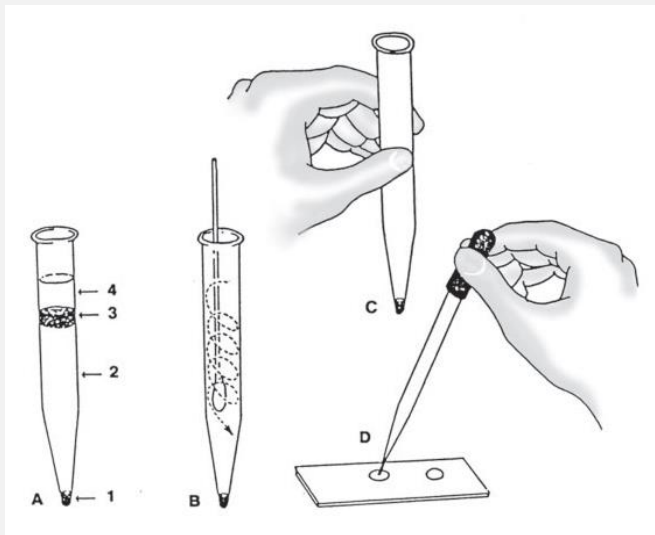
EXAME DIRETO A FRESCO



Exame direto a fresco de amostras fecais. A) gota de solução salina 0,85% e iodo em uma lâmina; B) porção emulsificada de fezes não preservadas nos diluentes; C) gotas de suspensão fecal preservada; D) densidade correta da preparação. (Adaptada de Melvin DM, Brooke MM. Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites. 3rd ed. USDHHS PHS (CDC), 82-8282, 1982).

TÉCNICAS DE CONCENTRAÇÃO

- **As técnicas de concentração** figuram entre os procedimentos de rotina, como parte de um exame completo das fezes, para a pesquisa de parasitos e o diagnóstico de um pequeno número de organismos que foram omitidos, quando foi usado somente o exame direto a fresco.
- **Os três principais objetivos dessas técnicas são:** 1) aumentar o número de cistos, oocistos, ovos ou larvas na preparação; 2) eliminar a maioria dos detritos fecais; e 3) apresentar os organismos em um estado inalterado, facilitando sua identificação.
- As técnicas de concentração se dividem em: flutuação e sedimentação



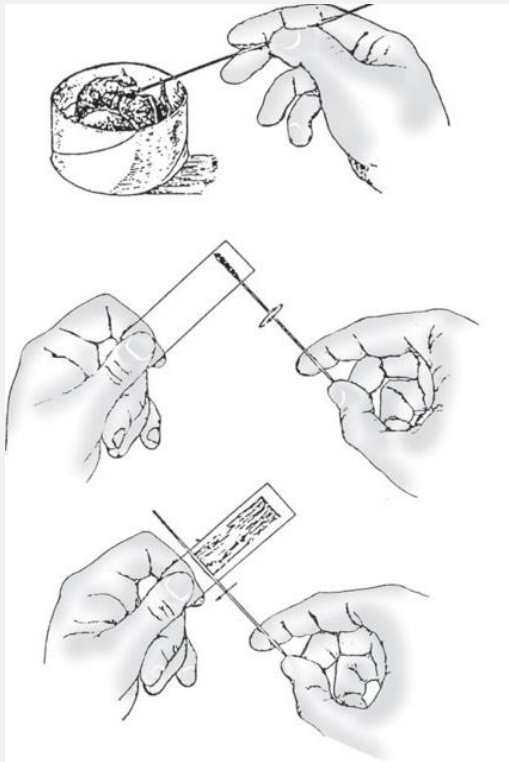
Centrífugo-sedimentação pela formalina-éter
1.^a) sedimento no fundo do tubo contendo os parasitos; 2.^a) camada de formalina; 3.^a) tampão de detritos fecais; e 4.^a) camada de éter na superfície

Preparação de esfregaço fecal para coloração permanente.

Princípio: Produzir contraste de coloração entre os artefatos do fundo da preparação e os parasitos presentes; permitir o exame e o reconhecimento dos detalhes morfológicos do organismo. Indicado para identificar e diagnosticar protozoários intestinais.

Amostra: Amostras fecais frescas ou preservadas pelo formaldeído, fixador APV, SAF ou MIF.

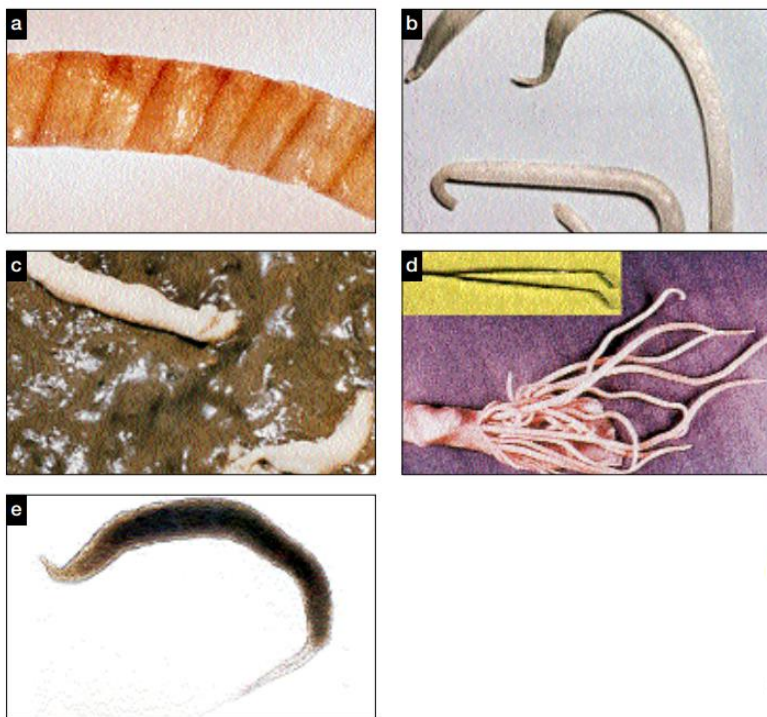
Reagentes: Colorações pelo tricrômico, **hematoxilina férrica** e outras.



Preparação de esfregaço fecal para coloração permanente

Artefatos que Podem Ser Confundidos com Organismos Parasitos

- As fezes consistem em vários elementos, entre os quais estão incluídos: a) restos de alimentos não digeridos; b) material alimentar digerido; c) células epiteliais, muco e outras secreções do trato intestinal, e d) vários tipos de microrganismos, tais como bactérias e leveduras;
- Muitos resíduos sejam responsáveis por uma incorreta identificação de trofozoítos e cistos de protozoários e ovos e larvas de helmintos.

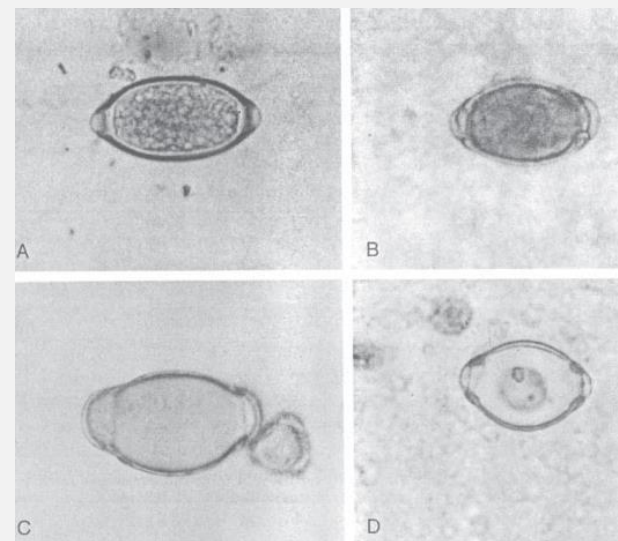


Macroscopic examination

Rolled-up tomato or onion skins [I2a] can appear to be roundworms; citrus fruit segments or bean sprouts [I2b] can mimic adult pinworms [I2e]; and mucus casts [I2c], often seen in persons whose food intake includes bulk-producing food fiber such as psyllium husk, can be mistaken for adult *Ascaris* species [I2d]

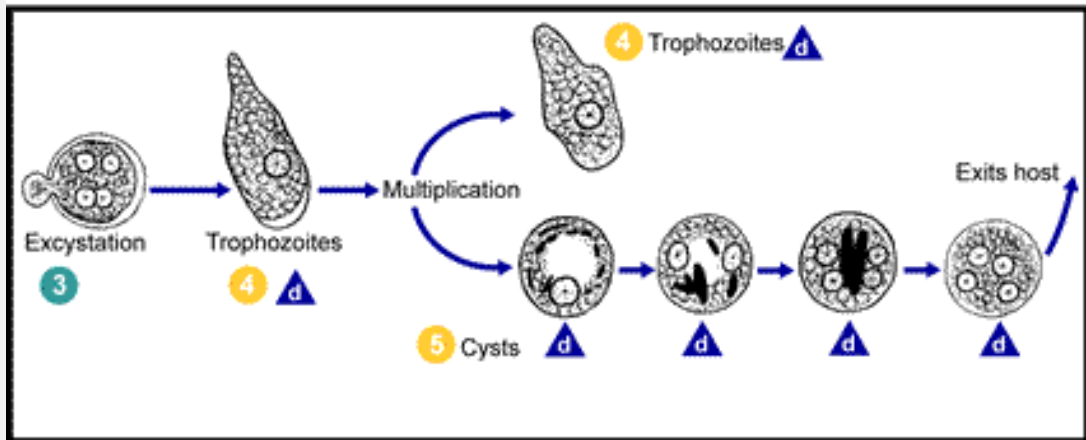
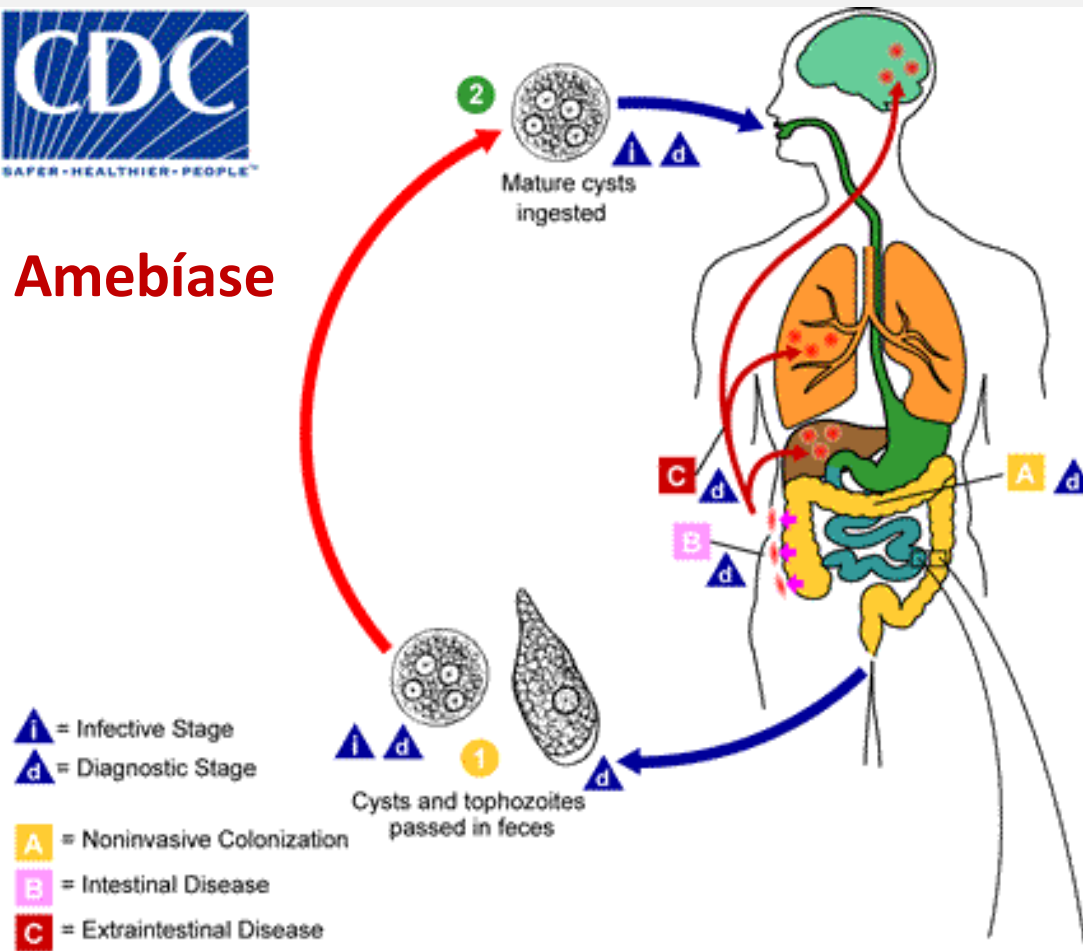
Tabela 6.1
Artefatos que se Assemelham com Organismos Parasitos

| <i>Material Clínico e Artefatos</i> | <i>Semelhança</i> |
|---|---|
| Fezes Amebas de vida livre, flagelados e ciliados Helmintos de vida livre, ovos de helmintos ou ovos de insetos Células de leveduras | Amebas parasitas, flagelados e ciliados Ovos de helmintos, larvas ou vermes adultos <i>Cryptosporidium</i> spp., <i>Cyclospora</i> spp., microsporídios, ovos de helmintos e cistos de protozoários Esporos de microsporídios Ovos de helmintos |
| Bactérias Fungos Resíduos de plantas Células | Cistos de protozoários, ovos de helmintos |
| Pêlos de raízes Grãos de pólen Cristais em suco de abacaxi | Larvas de nematóides Ovos de helmintos (<i>Ascaris</i> ou <i>Taenia</i>) Cristais de Charcot-Leyden |
| Células humanas Neutrófilo polimorfonuclear (PMN) Sangue recém-colhido (células frescas) Sangue velho (células desintegradas) Macrófago Células epiteliais | PMNs normal em esfregaço de sangue Cistos de <i>Entamoeba histolytica</i> Trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> Trofozoítos de amebas |
| Sangue Plaquetas Inclusões anormais das hemácias (corpos de Howell-Jelly, anel de Cabot) Contaminantes Leveduras Bactérias Plantas ou fibras de poeira Precipitado de corante | Parasitos da malária, <i>Babesia</i> spp. Parasitos da malária, <i>Babesia</i> spp. Parasitemia fúngica Bacteremia Microfilárias Malária, <i>Babesia</i> spp. |
| Líquidos orgânicos Tufos de cílios desintegrados | Protozoários ciliados ou flagelados |
| Espécimes do trato respiratório Leveduras | <i>Pneumocystis carinii</i> , <i>Cryptosporidium</i> spp. |
| Urina <i>Trichomonas hominis</i> (contaminada com fezes) Bactérias | <i>Trichomonas vaginalis</i> Esporos de microsporídios |



A) Ovo de *Trichuris trichiura*; B, C, D) Artefatos semelhantes a ovos, nas fezes de pessoas que ingeriram “Australian bee pollen”

Amebíase



Amebíase

- **Agente etiológico** *Entamoeba histolytica*: A *E. histolytica* é o agente etiológico da amebíase, sendo a única ameba patogênica para a espécie humana. A presença de outras amebas parasitando o homem, apesar de não trazerem repercussões clínicas, indica a ingestão de alimentos sólidos ou líquidos contaminados com fezes

- **Mecanismos de transmissão**

- Ingestão de cistos

- Direta: fecal-oral

- Indireta: água ou alimentos contaminados

- **Sintomatologia**

- Forma assintomática

- Forma intestinal (não invasiva)

- dores abdominais (cólicas)

- diarréias (pode ficar crônica)

- (Diarréias, Colites, Úlceras, Perfurações, Peritonite, Apendicite, Amebomas)

- Forma intestinal invasiva

- colite amebiana aguda, disenteria grave (fezes líquidas)

- úlceras intestinais, abscessos

- Forma extra-intestinal

- fígado (+ comum), pulmão (raro), cérebro (raro), pele (região perianal e órgãos genitais)

Diagnóstico

Material colhido:

- Fezes
- Soro

Diagnóstico Clínico

-Diarréia/síndrome do cólon irritável

Diagnóstico Laboratorial - Parasitológico

Cultura de fezes

Nas fezes sólidas: Pesquisa de cistos (diferenciar amebas não patogênicas)

Nas fezes líquidas: Pesquisa de trofozoítas

Diagnóstico Imunológico

Nas fezes: Pesquisa de antígenos por **ELISA**

No soro: Pesquisa de anticorpos por **ELISA** - amebíase invasiva

Diagnóstico Molecular

Pesquisa por **PCR** (distingue espécies)

Problemas

Diagnóstico diferencial amebas não patogênicas

E . histolytica x E. coli

E . histolytica x E. dispar

Amebíase

- **Exame direto a fresco** é um procedimento simples e eficiente para o estudo das fezes, permitindo observar as formas trofozoíticas vivas dos protozoários. Os trofozoítos em preparações salinas usualmente apresentam a forma amebóide.

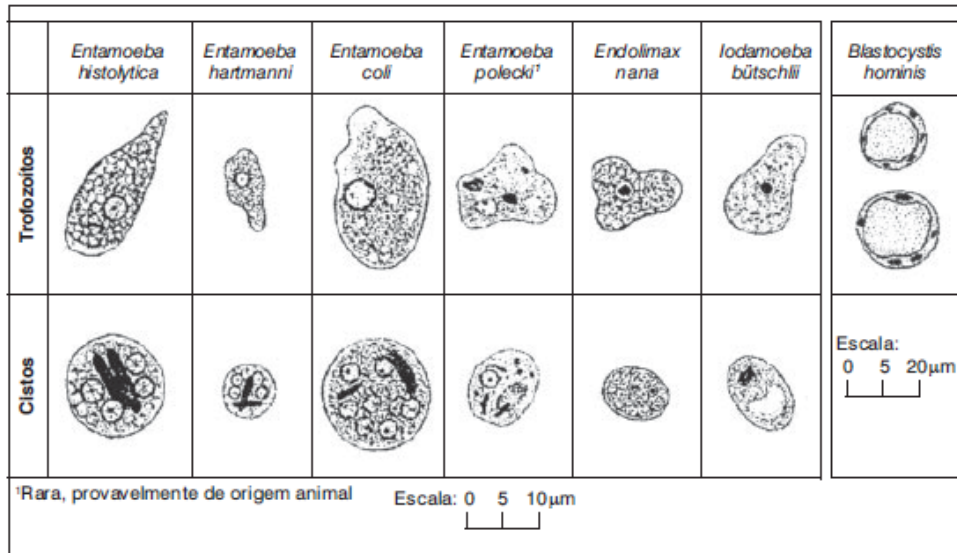


Fig. 38.1 — Amebas encontradas nos espécimes fecais humanos. (Adaptada e reproduzida. Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)

E. histolytica e a *E. dispar* são morfologicamente idênticas, mas espécies geneticamente distintas. Não existem evidências de invasão tissular ou inflamatória do cólon associada com a *E. dispar*. Na ausência de eritrócitos fagocitados, a patogênica *E. histolytica* é morfologicamente indistinguível da não-patogênica *E. dispar*.

Tricomoníase

Agente etiológico *Trichomonas vaginalis*

Mecanismos de Transmissão

1. Relação sexual (+ frequente)
2. Durante o parto
3. Outras formas de transmissão
 - roupa íntima ou de cama
 - instalações sanitárias

Patogênese

Mecanismos moleculares:

- Infecta o epitélio do trato genital
- A capacidade de adesão tem papel muito importante na patogênese
- Adesão dá-se através de proteínas:
 - Adesinas (tratamento com tripsina abole adesão)
 - Cisteíno-proteases extracelulares que digerem mucinas e imunoglobulinas
- Reinfecções - ausência de imunidade adquirida

Na mulher

Assintomática: 25 a 50% dos casos

Vaginite aguda:

- Corrimento vaginal fluido, bolhoso e abundante de cor amarelo-esverdeada
- Prurido ou irritação vulvovaginal
- Dor durante as relações sexuais
- Dor ao urinar (disúria)
- Dor pélvica

Vaginite crônica: sintomas leves

No homem:

Assintomática (maioria)

Uretrite aguda:

- Corrimento abundante
- Escasso corrimento
- Dor ao urinar (disúria)
- Prurido

Complicações (raras): epididimite, infertilidade e prostatite

*Aumenta a transmissão do HIV

Diagnóstico

Material colhido:

- Mulher: Secreção vaginal
- Homem: Secreção uretral, urina, esperma, secreção prostática e material sub-prepucial

Diagnóstico Laboratorial - Parasitológico

- Exame microscópico de preparações a fresco ou coradas
- Cultura do parasito (resultados em 3 a 7 dias)

Diagnóstico Imunológico

- Imunofluorescência direta (+sensível + cara)

Tratamento

- Deve incluir todos os parceiros sexuais
- Derivados nitroimidazólicos:
 - Metronidazol
 - contra-indicado para grávidas (1º trimestre)
 - linhagens de parasitas resistentes
 - Tinidazol
 - Ornidazol
 - Nimorazol

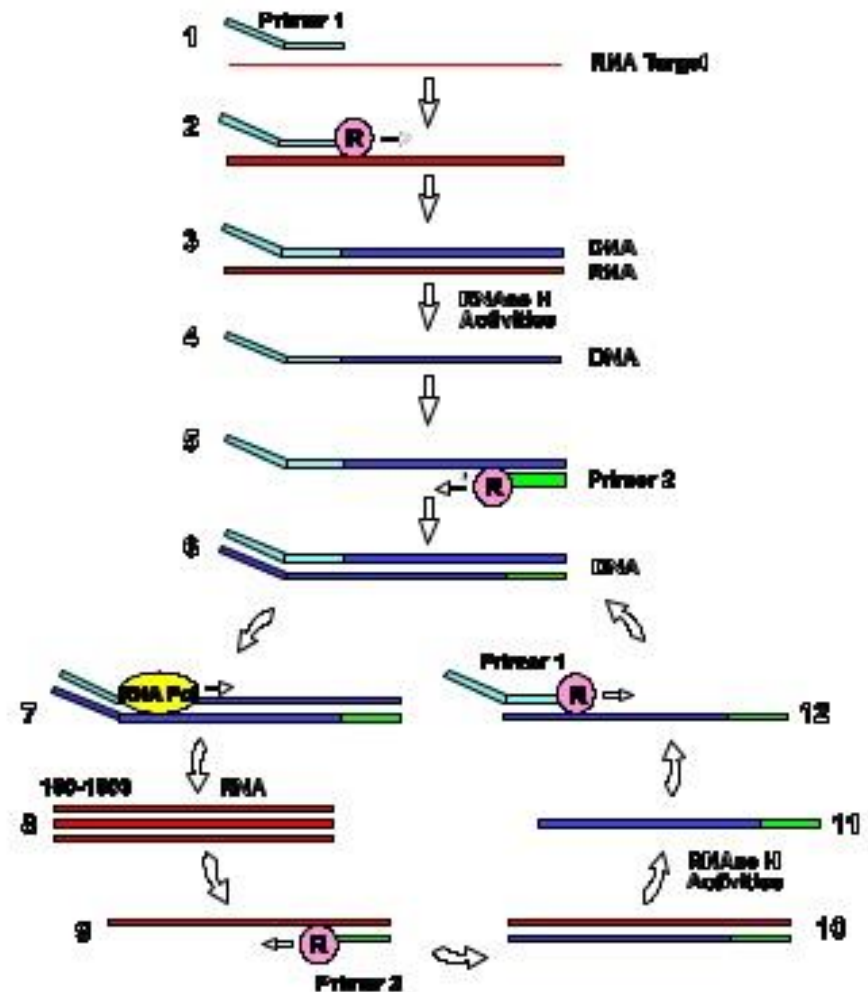
Table 1: Overview and characteristics of diagnostic assays for *Trichomonas vaginalis**

| Diagnostic Test | Technique | Time to Result | Specimen | Sensitivity | Specificity | Comments |
|---|--|----------------|---|-------------|---|--|
| Wet mount | Microscopic visualization | Minutes | Vaginal or urethral discharge | 51–65% | up to 100% | Inexpensive; technician-dependent |
| Culture | Culture media | 24–120 hours | Vaginal or urethral swab | 75–96% | up to 100% | Considered diagnostic gold standard in the past |
| OSOM <i>Trichomonas</i> Rapid Test | Immunochromatographic capillary-flow enzyme immunoassay dipstick | 10 minutes | Vaginal swabs or saline for wet mount | 82–95% | 97–100% | CLIA-waived for females; can be used at the point-of-care |
| Affirm VPIII Microbial Identification Test | Nucleic acid probe test | 45 minutes | Vaginal swabs | 63% | 99.9% | Moderately complex same-day test; FDA-cleared for use with specimens from females; also detects <i>Gardnerella vaginalis</i> and <i>Candida albicans</i> |
| APTIMA <i>Trichomonas vaginalis</i> Assay | Transcription Mediated Amplification (TMA) | Hours | Urine specimens, endocervical and vaginal swabs, and specimens collected in PreservCyt Solution | 95–100% | 95–100% | NAATs are the most sensitive tests; FDA-cleared for use with specimens from symptomatic or asymptomatic females |
| BD ProbeTec <i>Trichomonas vaginalis</i> Q ² Amplified DNA Assay | Strand Displacement Amplification (SDA) | Hours | Not an FDA-cleared product | | Variety of female specimens have been tested | |
| PCR | Polymerase Chain Reaction | Hours | No FDA-cleared kit | | Variety of male and female specimens have been tested | |

*Ranges of sensitivities and specificities were summarized for multiple specimen types and include comparisons to multiple methods, based on published data (i.e., unpublished data from package inserts were not included).

Transcription-Mediated Amplification

- One primer contains a T7 promoter sequence for RNA polymerase that hybridizes to the target RNA
- RT creates a cDNA of the target RNA by extension from the 3' end of the promoter-primer
- The RNA of the resulting RNA:DNA duplex is degraded by the RNase H activities of the RT
- A second primer then binds to the cDNA containing the promoter sequence from the T7 promoter-primer



Giardíase

Agentes etiológicos *Giardia lamblia* , *G. duodenalis* ou *G. intestinalis*.

Cosmopolita

Atinge principalmente crianças de 8 meses à 10-12 anos (creches)

Surtos epidêmicos veiculados por água

Mecanismos de Transmissão

Cistos são responsáveis pela transmissão (sobrevivem na água)

Água e alimentos contaminados

Transmissão direta pelas mãos (fecal-oral)

Patogênese

- Processo principalmente mecânico
- Parasitas em grande quantidade aderem e recobrem a parede do duodeno
- Marcas deixadas quando o parasita descola, arrancando as microvilosidades
- Evidências da presença de uma toxina (CRP136)
- Não ocorre invasão da mucosa
- Revestimento da parede do duodeno dificulta a absorção intestinal - diarréia
- Grande número de trofozoítas é eliminado.

Sintomatologia - Variável

Forma assintomática

Forma sintomática (agudo-crônico)

- Aguda, intermitente e autolimitante
- Dores abdominais (cólicas)
- Diarréia (líquida) - muco + gordura - ausência de hemáceas
- Má absorção intestinal

Diagnóstico

Material colhido:

- Fezes
- Fluido duodenal
- Soro
- Água contaminada

Diagnóstico Laboratorial – Parasitológico

Nas fezes formadas: pesquisa de cistos com salina ou lugol pelo **método de Faust**;

Nas fezes diarréicas: pesquisa de trofozoítos ou cistos (imediatamente após a coleta ou colocar em soluções conservantes pois os trofozoítos têm viabilidade curta);

No fluido duodenal: pesquisa de trofozoítos em biópsia jejunal ou “**Entero-test**” (para casos de diarréia crônica).

Diagnóstico Imunológico

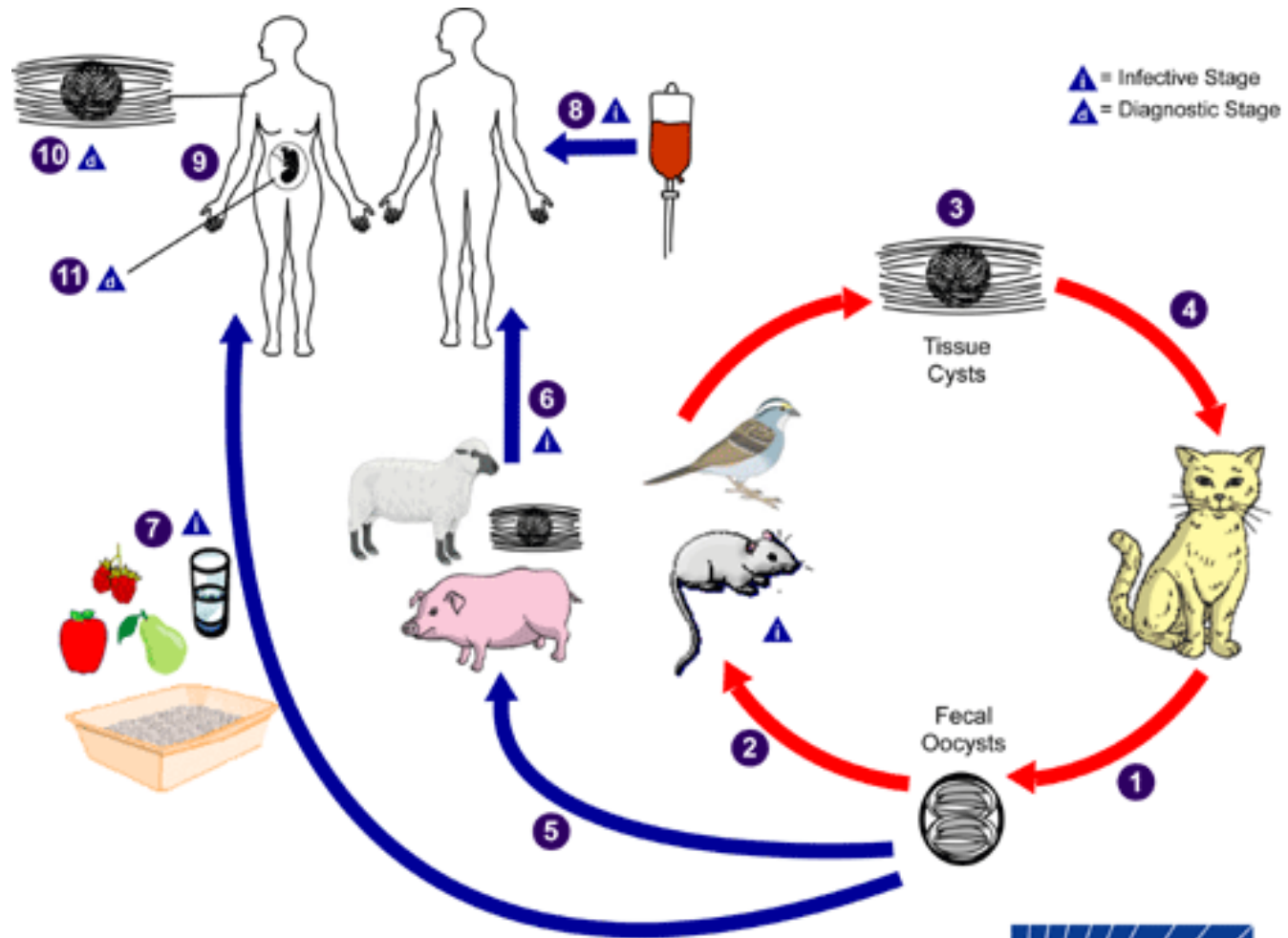
No soro: pesquisa de anticorpos por **ELISA** ou **IFI** (pouco sensível e específico);

Nas fezes: pesquisa de antígenos por **ELISA** (sensibilidade e especificidade altas).

Diagnóstico Molecular

Amostras de água: pesquisa de DNA parasitário por **PCR**.

Toxoplasmosis



Toxoplasmose

Agente etiológico *Toxoplasma gondii*

Parasita intracelular obrigatório.

Distribuição mundial.

Prevalência aumenta com a idade.

OMS estima que 50-60% da população mundial esteja infectada.

Reservatórios naturais: mamíferos e aves.

Infecta quase todos os tipos de células nucleadas.

Hospedeiro definitivo: gato doméstico e outros felinos.

Tem caráter oportunista em pacientes imunocomprometidos.

Infecção do Hospedeiro Intermediário

Fase Aguda

Taquizoítas (*grego taqui=rápido*) são então liberados e irão invadir novas células.

Disseminam-se por via sanguínea ou linfática.

Invadem o tecido muscular, nervoso (cérebro) e vísceras.

Podem cruzar a barreira hemato-encefálica e transplacentária.

Fase crônica (perpetua a infecção)

Quando a resposta imune torna-se mais potente, o parasita passa a se dividir mais

lentamente e formam-se cistos teciduais contendo formas conhecidas como **bradizoítas**

(grego bradi=lento).

Transmissão

Ingestão de oocistos maduros (**esporozoítas**) eliminados pelas fezes de gatos ou outros felinos

Ingestão de cistos (**bradizoítas**) presentes em carne crua ou mal cozida (porco, carneiro)

Ingestão de leite cru (não pasteurizado)(**taquizoítas**)

Transplante de órgãos ou transfusão sanguínea (**taquizoítas**)

Transmissão placentária (**taquizoítas**)

Inoculação acidental (**taquizoítas**)

Patogenia

Normalmente assintomática (~ 90% dos indivíduos)

Doença severa:

1) toxoplasmose congênita (transmissão materno-fetal).

- Marcador sorológico – IgM e IgA

- Risco de transmissão aumenta com o tempo de gravidez

- Gravidade da doença no feto é inversamente proporcional ao tempo de gestação.

2) toxoplasmose ocular em adultos imunocompetentes.

3) neurotoxoplasmose (perda de um sistema imune funcional).

Diagnóstico

Diagnóstico Clínico - Sugestivo

→ Fase Aguda

Diagnóstico Laboratorial – Parasitológico:

Pesquisa do parasita em biópsia ou necropsia

Isolamento em cultura de células (a partir de amostras clínicas)

Inoculação de amostras clínicas em animais de laboratório

Diagnóstico imunológico

Pesquisa de IgM ou IgG muito utilizado

Diagnóstico Molecular

Pesquisa por PCR

→ Fase crônica

Diagnóstico imunológico – detecção de IgG

Perfis de diagnóstico imunológico:

- Perfil I (**fase aguda**): IgM, IgA e IgE presentes. IgG de baixa avidéz em alta ou em elevação.
- Perfil II (**período de transição**): IgA e IgE ausentes. IgM baixa. IgG com avidéz crescente.
- Perfil III (**fase crônica**): IgG com alta avidéz e títulos baixos. Outras classes ausentes.

Diagnóstico - Toxoplasmose Congênita

Feto/Recém nascido:

Diagnóstico Laboratorial - Parasitológico

No líquido amniótico: Pesquisa do parasita

No creme leucocitário: Pesquisa do parasita no recém-nascido (90% de sensibilidade)

Diagnóstico Imunológico

No Sangue: Pesquisa de anticorpos (pode ser mais difícil por causa dos anticorpos da mãe)

*Altos títulos de anticorpos no recém-nascido com mãe com perfil I ou II é altamente sugestivo

Diagnóstico Molecular

No líquido amniótico: Pesquisa de DNA do parasita

Acompanhamento da Gestante:

Diagnóstico imunológico - Exame pré-natal

Pesquisa de IgG (infecção crônica)

Pesquisa de IgM (trimestralmente se negativa – indica nova infecção)

Criptosporidiose

Agente etiológico *Cryptosporidium parvum*

Patogenia

Imunocompetentes:

Assintomáticos

Sintomáticos:

Diarréia: Autolimitada: cura espontânea. Intensa: ~20 evacuações/dia

Outros sintomas: dor abdominal, náuseas e vômitos, perda de peso, desidratação.

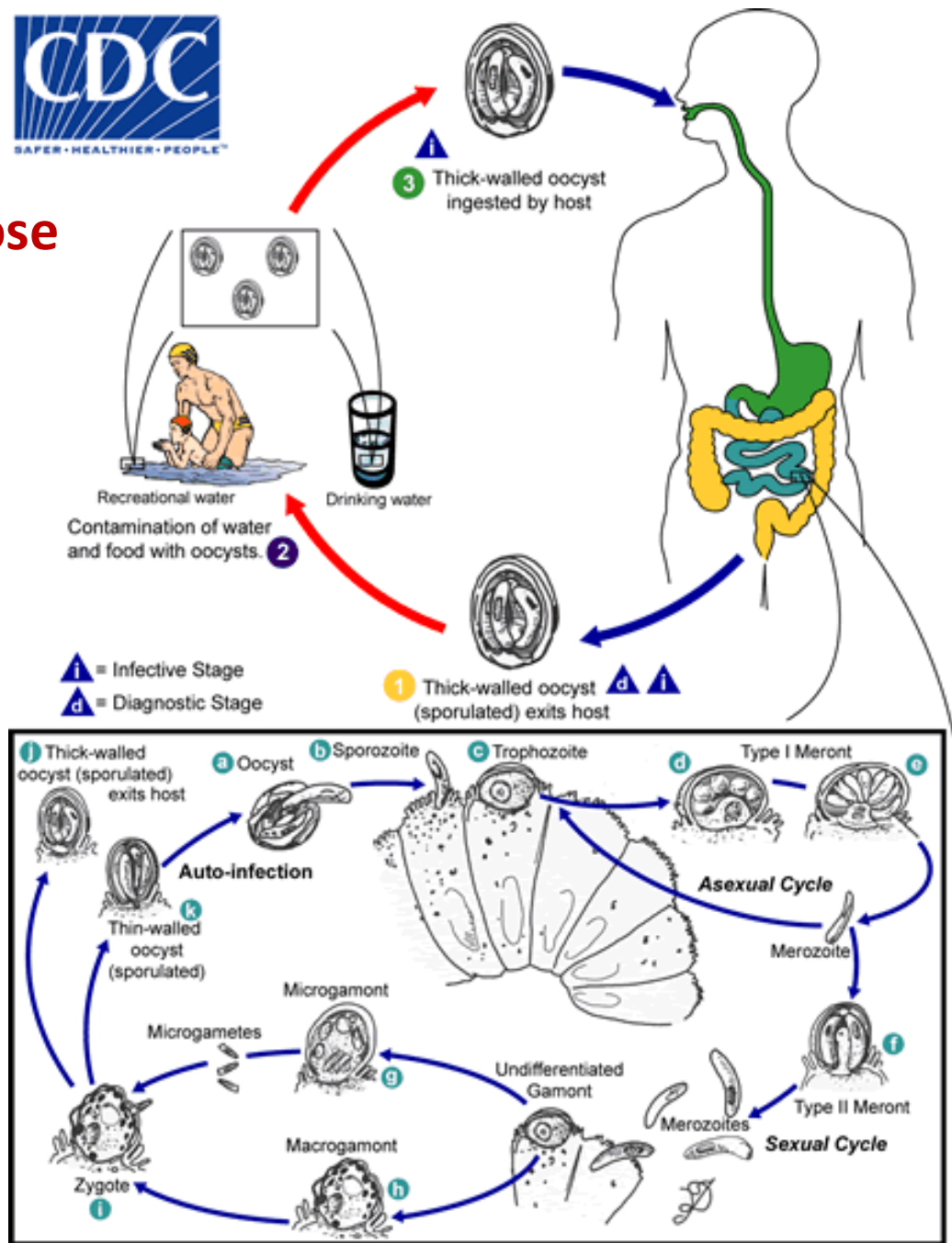
Imunocomprometidos:

Apresentam diarréia crônica e intermitente acompanhada de cólicas abdominais, perda de peso acentuada, febre alta e vômitos.

A intensidade e duração da diarréia está diretamente relacionada ao número de células T CD4+.

Manifestações extra-intestinais podem ocorrer em pacientes com AIDS (hepatite, pancreatite e criptosporidiose respiratória).

Criptosporidiose



Diagnóstico

Material colhido

- Fezes
- Aspirado duodenal e jejunal

Diagnóstico Laboratorial - Parasitológico

Fezes e outros líquidos orgânicos: Pesquisa de oocistos maduros

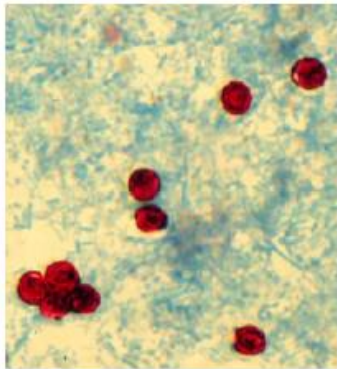
*Há necessidade de examinar múltiplas amostras de fezes

Método de Kinyoun

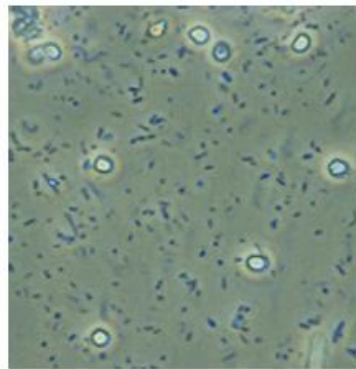
Exame direto das fezes (contraste de fases)

Diagnóstico imunológico

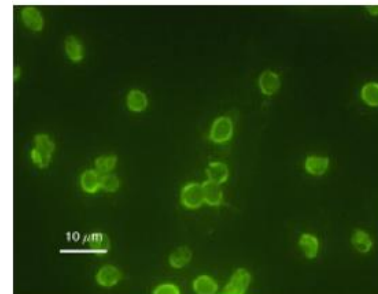
Fezes e outros líquidos orgânicos: Pesquisa de antígenos por IF ou Elisa



Método de Kinyoun



Exame direto
Contraste de fase



**Commercially available diagnostic kits for detection of *Cryptosporidium* spp.
(primarily in clinical specimens; partial list)**

| Kit Name (Clinical specimens) | Manufacturer/distributor | Type of test¹ | Sensitivity² | Specificity² | Comparison test | Reference |
|---|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|------------------|
| <i>ProSpecT/ Cryptosporidium</i> | Alexon, Inc. | EIA-plate | 97 | 98 | acid-fast stain, IIF ³ | 1 |
| | | | 98 | 98 | acid-fast stain | 2 |
| | | | 96 | 99.5 | M-DIF ⁴ | 3 |
| | | | 94 (97) | 99 (98) | M-DIF ⁴ , acid-fast, Color Vue | 4 |
| <i>IDEIA Cryptosporidium</i> | Dako Corp. | EIA-plate | 100 (93.1) | 100 (98.7) | auramine stain, N-DIF ⁵ | 5 |
| <i>MeriFluor™ Cryptosporidium/Giardia</i> | Meridian Diagnostics, Inc. | DFA, IgG | 100 | 100 | acid-fast stain | 6 |
| | | | 96 (100) | 100 (100) | acid-fast, ProSpecT, Color Vue | 4 |
| <i>Color Vue Cryptosporidium</i> | Seradyn, Inc. | EIA-plate | 93 | 93 | IIF ³ | 7 |
| | | | 76 | 100 | M-DIF ⁴ | 3 |
| | | | 94 (92) | 100 (100) | M-DIF ⁴ , acid-fast, ProSpecT | 4 |
| <i>Cryptosporidium</i> Antigen Detection Microwell ELISA | LMD Laboratories | EIA-plate | 66.3 | 99.8 | acid-fast, auramine | 8 |
| | | | 93 | 99 | IIF ³ | 9 |

1.¹ EIA = enzyme immunoassay; DFA = direct immunofluorescence assay, IIF = indirect immunofluorescence assay, NA = not available

2.² Percent specificity or specificity compared to conventional methods, numbers in parentheses indicate values reported by the manufacturer

3.³ IIF = indirect immunofluorescence (*MeriFluor Cryptosporidium/Giardia* assay)

4.⁴ M-DIF = direct immunofluorescence (*MeriFluor Cryptosporidium/Giardia* assay)

5.⁵ N-DIF = direct immunofluorescence (*DetectIF Cryptosporidium*, Shield Diagnostics, Ltd.)

Isosporose/Isosporíase

Agente etiológico *Isospora belli*

Imunocompetentes: geralmente assintomática ou com diarreia auto-limitada.

Imunocomprometidos: quadro diarréico grave (>10 evacuações/dia), acompanhado de febre, cólicas intestinais, vômitos, má absorção e emagrecimento.

Pode apresentar quadros de disseminação extraintestinal (linfonodos, fígado e baço).

Diagnóstico

Material coletado

- Fezes
- Aspirado duodenal
- Tecido (duodeno)

Diagnóstico Laboratorial - Parasitológico

Fezes: Pesquisa de oocistos elípticos de *I. belli* nas fezes.

Os oocistos encontrados nas fezes são imaturos (contendo 1 ou 2 esporoblastos).

Aspirados duodenais: Pesquisa de oocistos em aspirados duodenais.

Biópsia de tecido (duodeno).

Tratamento

Sulfametoxazol + Trimetropim

Ciclosporose/Ciclosporíase

Agente etiológico *Cyclospora cayetanensis*

Patogenia

Assintomáticos

Sintomáticos

Diarréia: autolimitada que dura 3 a 4 dias; podem ocorrer recaídas frequentes durante um período de 2 a 3 semanas.

Outros sintomas: dor abdominal, náuseas e vômitos, perda de peso, fadiga, febre.

Em indivíduos imunocomprometidos o quadro diarréico é crônico e intermitente.

Diagnóstico

Diagnóstico Laboratorial - Parasitológico

Fezes: Pesquisa de oocistos (imaturos)

*o número de oocistos eliminados nas fezes é muito baixo

Diagnóstico Molecular

Pesquisa por **PCR**

Tratamento

Sulfametoxazol + Trimetropim

Microsporidiose

Agentes etiológicos - 7 gêneros tem sido descritos como patógenos humanos

- *E nterocytozoon*: *E. bienewisi* (espécie mais encontrada em todo o mundo)
- *E ncephalitozoon*: *E. intestinalis*, *E. hellem*
- *P leistophora*
- *T rachipleistophora*: *T. hominis*, *T. Anthrpophtera*
- *V ittaforma*: *V. cornea*
- *B rachiola*: *B. Vesicularum*
- *N osema*: *N. connori*, *N. Oculorum*

Patogenia

- Infecção do trato gastrointestinal (*E. bienewisi* e *E. intestinalis*).
- Hepatite e Peritonite.
- Infecção ocular (ceratoconjuntivite).
- Sinusite.
- Infecções pulmonares (traqueobronquite, pneumonia).
- Infecções do trato urinário (cistite, nefrite).
- Miosite.
- Infecções cerebrais.
- Infecções sistêmicas.

→ Em imunocompetentes: pouca ou nenhuma sintomatologia.

Diagnóstico

Material coletado

- Fezes
- Urina
- Aspirado duodenal
- Bile
- Esfregaço da conjuntiva
- Fluidos nasofaríngeos

Diagnóstico Laboratorial - Parasitológico

Microscopia eletrônica

Métodos de coloração

Diagnóstico imunológico

Pesquisa por Imunofluorescência

Diagnóstico Molecular

Pesquisa por PCR

Tratamento

* Não há tratamento específico (Metronidazol, Albendazol...)

| Diagnostic target | Methods of choice | Pros and cons |
|--|---|---|
| <p>Microscopic detection of whole parasites in blood, faeces, urine or tissues (protozoa, helminth ova or larvae)</p> | <ul style="list-style-type: none"> •A variety of concentration methods and special staining procedures | <ul style="list-style-type: none"> •Diagnostic skills and microscopic equipment needed •Sensitivity not always optimal (need to examine several specimens spaced in time) •Specificity depends on microscopist •Methods fail during prepatent helminth infections and if humans are intermediate hosts of cestodes |
| <p>Parasitic DNA or RNA</p> | <ul style="list-style-type: none"> •PCR (Polymerase chain reaction) or nested PCR Conventional PCR •Real-time PCR •Nucleic Acid Sequence-based Amplification (real-time NASBA) •LAMP | <ul style="list-style-type: none"> •Methods with highest sensitivity and excellent specificity •Some false negative results due to inhibitors in sample •Time consuming procedure (except real time PCR and NASBA) •Investment in equipment and rather expensive reagents |
| <p>Direct detection of Parasite antigens in blood, stool or urine</p> | <ul style="list-style-type: none"> •Immunoassays with mostly specific monoclonal antibodies Immuno-enzyme methods (e.g. ELISA) •Direct fluorescent antibody tests •Immuno-chromatographic assays (“Rapid diagnostic tests”) | <ul style="list-style-type: none"> •High sensitivity •Detection of active infections •Efficient testing of many samples •False negatives due to inhibitory host antibodies |
| <p>Immune response against Parasite antigens (Detection of antibodies in serum)</p> | <p>Various indirect Immuno-assays using labelled anti-human immunoglobulin conjugates (e.g. Enzyme-Immunoassays, Indirect Fluorescent Antibody tests, Western blots and others)</p> | <ul style="list-style-type: none"> •High sensitivity •Limitations in specificity (due to crude antigen preparations) •Limitations in sensitivity (when recombinant antigens or synthetic peptides are used) •Early diagnosis before patent period (helminth infections) •Persistence of host antibodies after cure |

Cestóides

As teníases humanas

As três espécies mais comuns de cestóides parasitos do intestino delgado do homem são: *Taenia solium*, *Taenia saginata* e *Hymenolepis nana*, todas de distribuição mundial. As tênias parasitas (*Taenia* spp.), com exceção da *H. nana*, onde um simples hospedeiro é suficiente para o desenvolvimento da larva e do adulto, requerem um hospedeiro intermediário (bovino ou suíno), onde o estágio de larva se desenvolve depois da ingestão dos ovos, e um hospedeiro definitivo (homem), que alberga o verme adulto.

Quadro clínico da infecção

- . Geralmente assintomática
- . Aumento do apetite ou inapetência (em crianças)
- . Dor abdominal, náuseas, fraqueza
- . Eosinofilia (5-30%)
- . Complicações

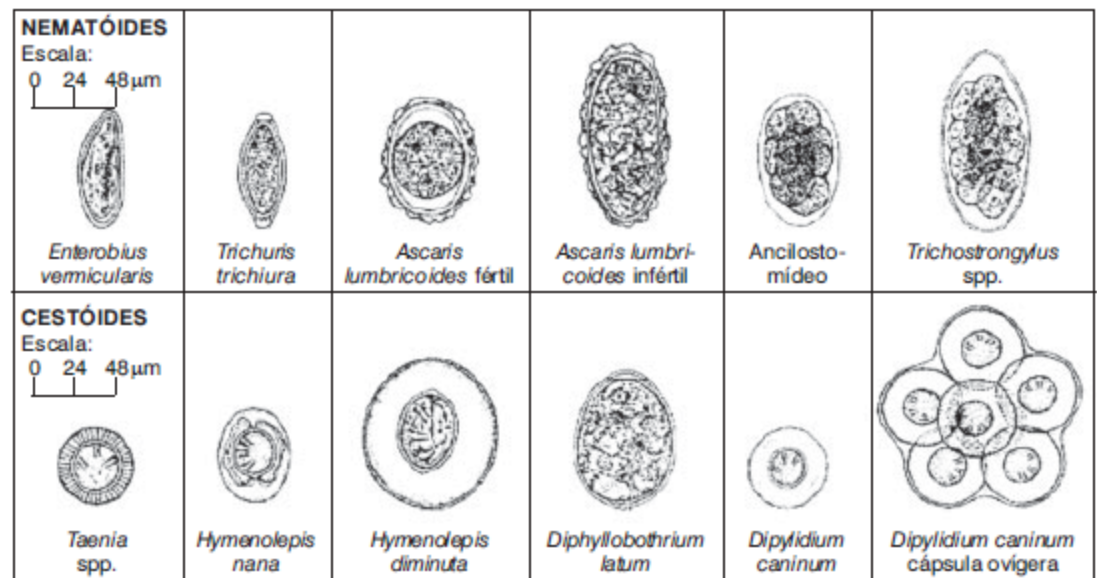
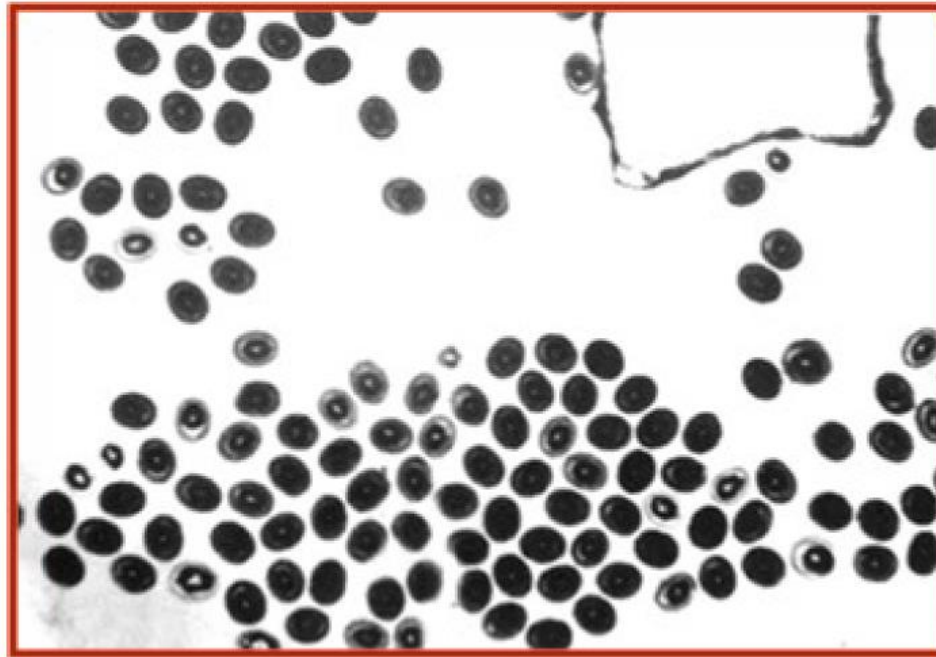


Fig. 38.4 — Ovos de nematóides e de cestóides encontrados nos espécimes fecais humanos. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)

Diagnóstico

.Pesquisa de ovos nas fezes ou na região perianal (com fita adesiva): não é possível diferenciar *T. solium* de *T. saginata*

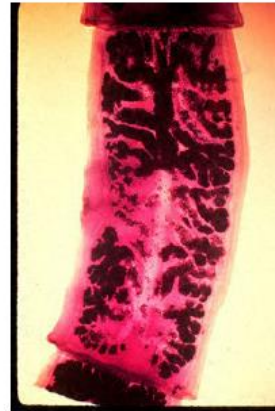
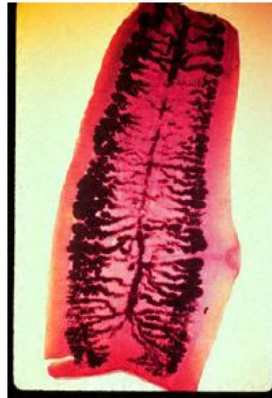


Diagnóstico

- **Pesquisa de proglótides:** fezes desfeitas para a busca de proglótides; proglótides colocadas entre lâminas e descoradas com ácido acético; análise das ramificações uterinas



T. saginata



T. solium



·Diagnóstico molecular: pesquisas científicas

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Feb. 2004, p. 548-553
0095-1137/04/\$08.00+0 DOI: 10.1128/JCM.42.2.548-553.2004
Copyright © 2004, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 42, No. 2

DNA Differential Diagnosis of Taeniasis and Cysticercosis by Multiplex PCR

Hiroshi Yamasaki,^{1*} James C. Allan,² Marcello Otake Sato,¹ Minoru Nakao,¹
Yasuhiro Sako,¹ Kazuhiro Nakaya,³ Dongchuan Qiu,⁴ Wulamu Mamuti,^{1,5}
Philip S. Craig,⁶ and Akira Ito¹

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. 2008, p. 286-289
0095-1137/08/\$08.00+0 doi:10.1128/JCM.01172-07
Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 46, No. 1

Nested PCR for Specific Diagnosis of *Taenia solium* Taeniasis^V

Holger Mayta,^{1,2} Robert H. Gilman,^{1,2*} Emily Prendergast,³ Janeth P. Castillo,²
Yeny O. Tinoco,⁴ Hector H. Garcia,^{2,5} Armando E. Gonzalez,⁴ and
Charles R. Sterling³ for the Cysticercosis Working Group in Peru

Cisticercose humana

Neurocisticercose: convulsão, hipertensão intracraniana

(cefaléia, vômitos em jato, vertigens, sonolência, distúrbios

respiratórios, epilepsia), distúrbios mentais

.**Oftalmocisticercose:** perturbação da visão e cegueira

.**Cisticercose disseminada:** dores, fadigas e câibras

Diagnóstico

.Clínico

.**Laboratorial:** exame do líquido, testes sorológicos (ELISA, RIFI), exame radiológico e tomografia, exames anatomopatológicos

Tratamento

.Cirúrgico

.Praziquantel: 50 mg por kg de peso corporal (VO) ao dia por 21 dias + dexametasona (antiinflamatório)

.Albendazol: 15 mg em 3 doses diárias por 30 dias + 100 mg de metilpredisolona no 1º dia seguido de doses de 20 mg/dia (anticonvulsivante)

Ascaris lumbricoides

Sintomatologia e Patologia

- Proporcional à carga parasitas (geralmente 10)
- Geralmente assintomáticos
- Pulmões

Edema inflamatório

Pneumonia

Síndrome de Loeffler (eusinófilos)

- Intestino

Dor abdominal

Náusea, emagrecimento

Má absorção de nutrientes

Diarréia

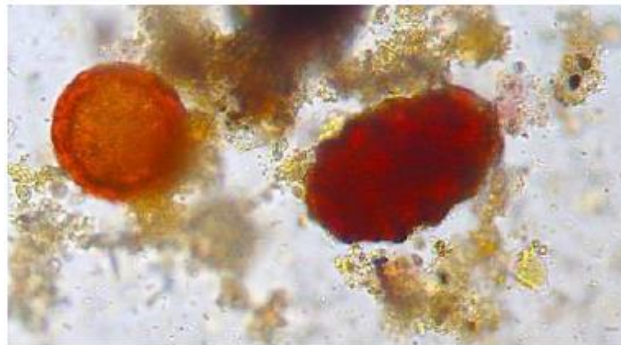
Obstrução intestinal

Perfuração do intestino

- Infecções intensas (problemas hepáticos), crianças

Diagnóstico

- Exame de fezes (ovos)
- Observação do verme
- Radiografias
- Imunológicos-ruins



40x60um

Tratamento e profilaxia

-Pirantel

-Mebendazol e Levamisol

-Piperazina (GABA)

Não são eficazes contra as formas larvais

Exame de fezes deve ser repetido

-Cirurgia

- Higiene

- Saneamento

Ovos sobrevivem a tratamento de esgotos mas não

50oC

Ovos podem ser aspirados com poeira

100 – 250 ovos por grama de terra

Trichuris trichiura (Tricuríase)

Sintomas, diagnóstico e tratamento

- Assintomáticos
- Irritações nas terminações nervosas
- Dor abdominal, diarreia, perda de peso
- Anemia proporcional a parasitemia (5ul sg/dia/verme)

Procura de ovos nas fezes



Mebendazol

-Pamoato de Oxantel

Enterobius vermiculares

Transmissão

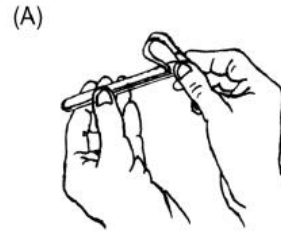
- Heteroinfecção
 - Auto-infecção externa (oral)
 - Auto-infecção interna (retal)
- Transmissão intradomiciliar,
instituições

Sintomatologia

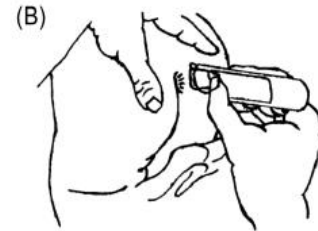
- Número de vermes (1 ou 10.000)
- Prurido anal (noturno)
- Hemorragia anal
- Diarréia, colite e emagrecimento
- Perfurações da parede do peritônio

Diagnóstico

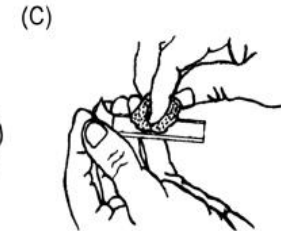
- “Swab anal”
- Exame de fezes
- Eosinofilia



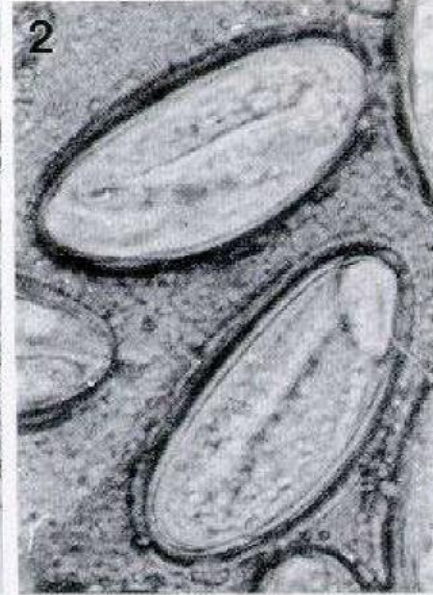
Aplique uma fita colante a uma lâmina ou espátula



Toque a superfície colante (externa) várias vezes na região perianal



Coloque a fita em uma lâmina de microscopia, com uma gota de tolueno ou xilol iodado



Strongyloides stercoralis

Patologia e Sintomatologia

Lesões cutâneas

Pulmões

Hemorragia, Pneumonia

Síndrome de Loeffler (eusinófilos)

Intestino

Diarréia

Dores abdominais

Eosinofilia

Emagrecimento e anemia

Lesões, Hemorragias

Infecções

Perfuração do intestino, obstrução

Diagnóstico

- **Larvas nas fezes**
- **Coprocultura- Harada-Mori (1-2sem)**
- **Testes imunológicos**

RID: 90% dos casos

ELISA e WB: alguns cruzados

- **Tiabendazol (adultas, repetir)-70 a 90% cura**

Efeitos colaterais

- **Ivermectina- bem tolerada**

Tratamento

Controle

- Saneamento básico**
- Homem como reservatório**
- Pés calçados**
- Tratamento dos doentes**

Ancilostomídeos

A doença- Ancilostomíase

- Carga parasitária**
- Problemas pulmonares**
- Intestinos**

Dilacerações

Infecções

Modificação das pregas intestinais

Perda de sangue

30 (Na) – 260 μ l (Ad)/dia /verme

100 – 1000 parasitos – 30-260 ml

3.500 parasitos – 105-910 ml

Sintomas, diagnóstico e tratamento

Amarelão

- Anemia
- Coceira
- Tosse
- Dor abdominal
- Subnutrição
- Ovos nas fezes
- Eosinofilia
- Mebendazol
- Albendazol
- Levamisol
- Pirantel
- Reposição de Fe

Controle

- Saneamento básico
- Uso de calçados
- Combate às larvas no solo: plantio de capim-cidreira e outros
- Medicamentos- repetição
- *Ancylostoma*: também por ingestão (sem ciclo pulmonar)

Larva migrans

- Hospedeiro “errado”

-Larva não evolui

Penetração pela pele: retidas sob a pele

Larva migrans cutânea

Via oral: “encalham” no fígado, pulmão, outros

Larva migrans visceral

Larva migrans cutânea

Tratamento

Tiabendazol tópico ou oral

Controle

Praias (escolher áreas alagadas)

Tanques de areia

Larva migrans visceral

Difícil diagnóstico:

Clínico, radiológico, biópsia de fígado, sorologia (ELISA)

-Tratamento:

Tiabendazol e dietilcarbamazina (DEC)

Corticosteróides

Problema mundial

-Europa, Am Norte e Ásia: 15 a 54% cães infectados

-Ovos resistentes

Controle:

Tratamento periódico cães e gatos

Proteção parques infantis

Redução cães e gatos vadios

Nematódios intestinais: diagnóstico

| Espécie | Estágio diagnóstico | Método diagnóstico |
|----------------------------------|---------------------------------------|---|
| <i>Ascaris lumbricoïdes</i> | ovo | exame direto, técnicas de concentração, Kato-Katz |
| <i>Trichuris trichiura</i> | ovo | exame direto, técnicas de concentração, Kato-Katz |
| Ancilostomídeos | ovo (às vezes larvas são encontradas) | exame direto, técnicas de concentração, Kato-Katz |
| <i>Strongyloides stercoralis</i> | larva rabditóide | pesquisa de larvas (Baermann, Rugai) |
| <i>Enterobius vermicularis</i> | ovo | swab anal |

ESQUISTOSSOMOSE

Reação a penetração das cercárias

- Dermatite cercariana**
- Reações pulmonares**

Fase aguda ou inicial

- Reação Toxêmica (sensibilidade)**
- Febre, mal estar, linfadenopatia**
- Esplenomegalia sem relação com os ovos**

Fase crônica

- **Reação imunológica contra os ovos**
- **Aproximadamente metade dos ovos ficam no hospedeiro**
- **Ovos localizados no Fígado**

Macrófagos – Eosinófilos – Linfócitos

Fusão de macrófagos (gigantócitos)

Fibroblastos

Calcificação

Fusão de vários processos inflamatórios

GRANULOMA

- Granuloma hepático-fibrose**
- Bloqueio da drenagem pela veia porta**
- Aumento da pressão do sangue**
- Ascite**
- Lesões cardiopulmonares**
- Lesões renais e neurológicas**
- Edemas e congestão no estômago e intestino**
- Varises no esôfago:
rompimento/hemorragias=óbito**

Diagnóstico

- Procura de ovos nas fezes- 3x
(poucos)

Retenção de ovos- biópsia retal

- Métodos imunológicos

Imunofluorescência, ELISA-
melhor para agudos

Reação Intradérmica com
extrato (15min)

- Diagnóstico clínico

Tratamento

Vias metabólicas

Schistosoma depende da via
glicolítica para a obtenção de
energia.

Antimoniais afetam a
fosfofrutoquinase

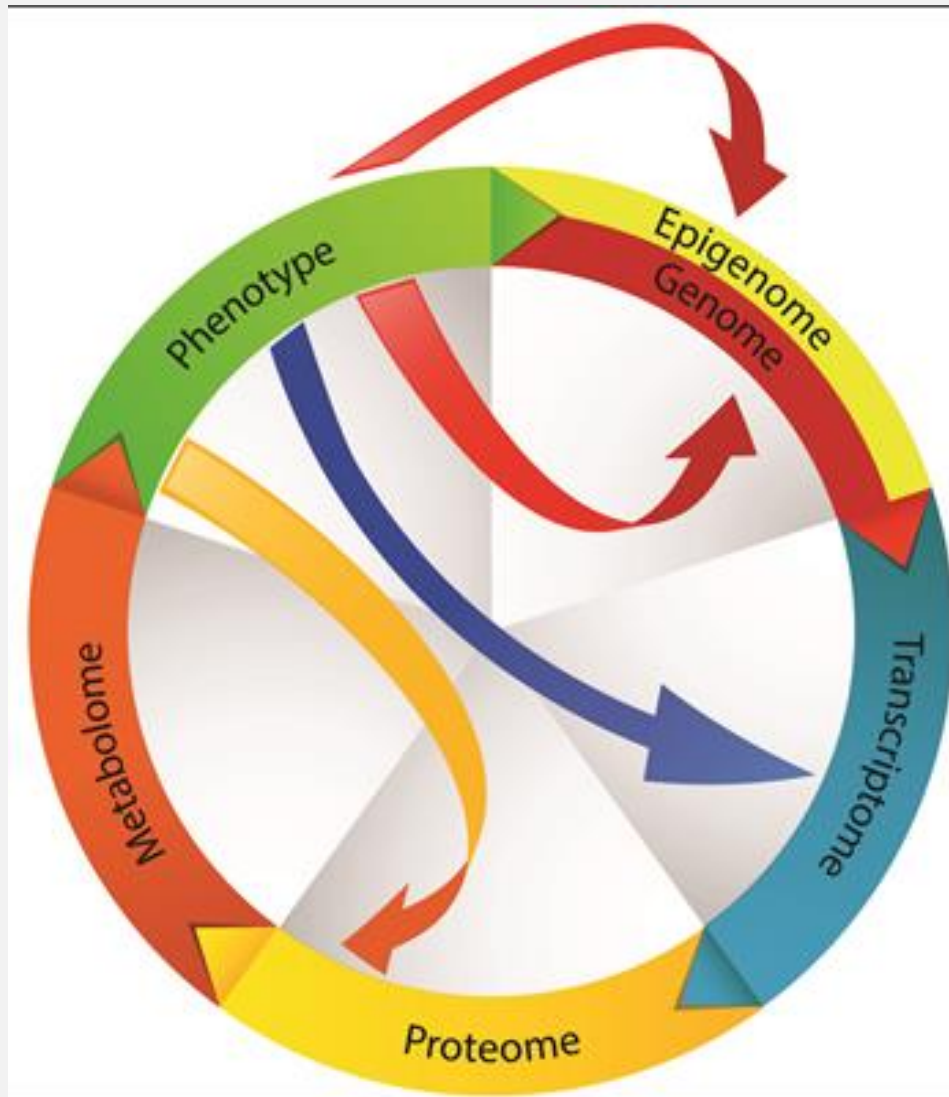
Em *Schistosoma*, a contração
muscular depende de Ca^{2+}
externo

Further readings

<http://www.cdc.gov/dpdx/az.html>

New diagnostic tools

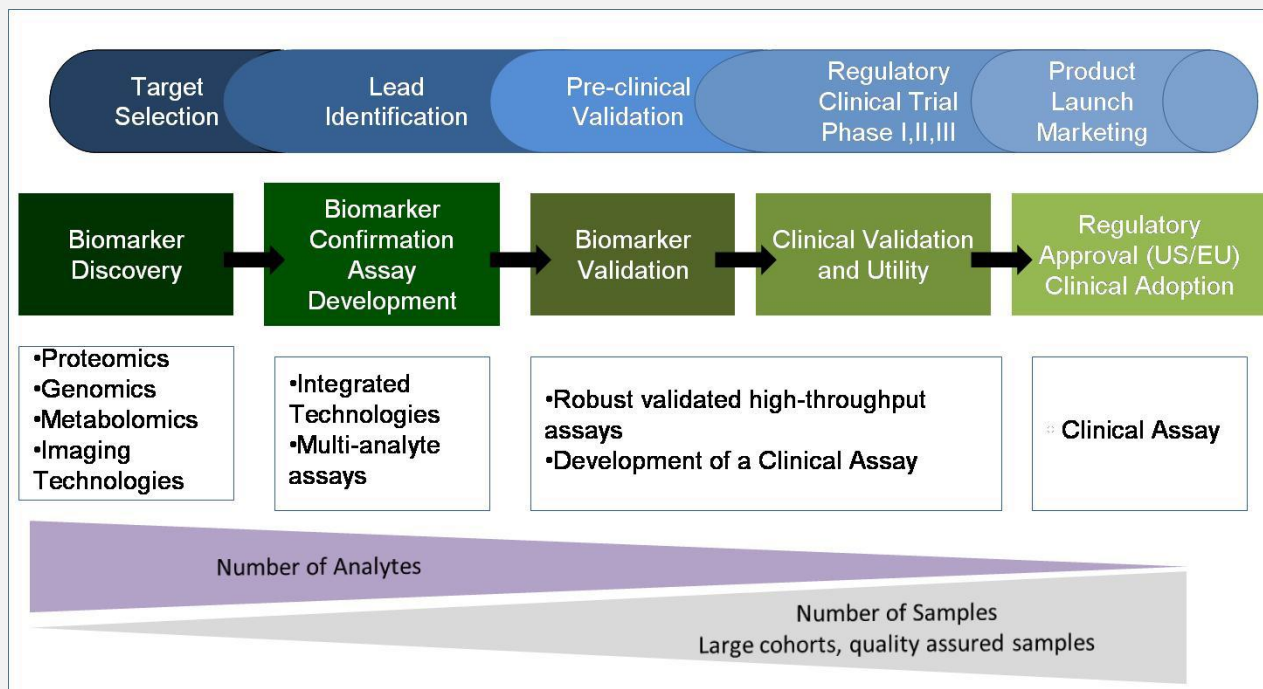
The omic's revolution



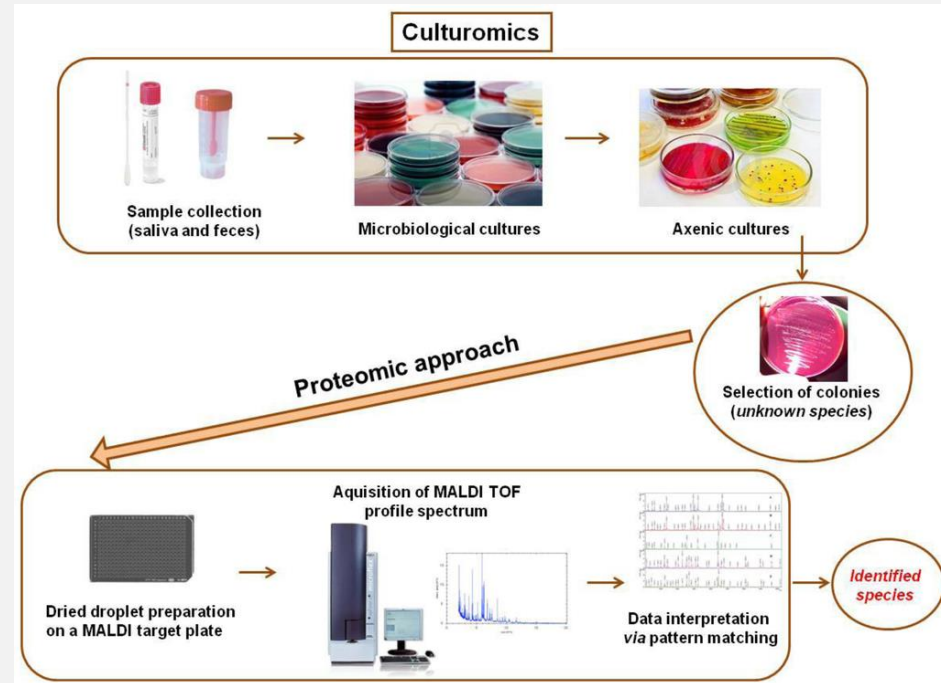
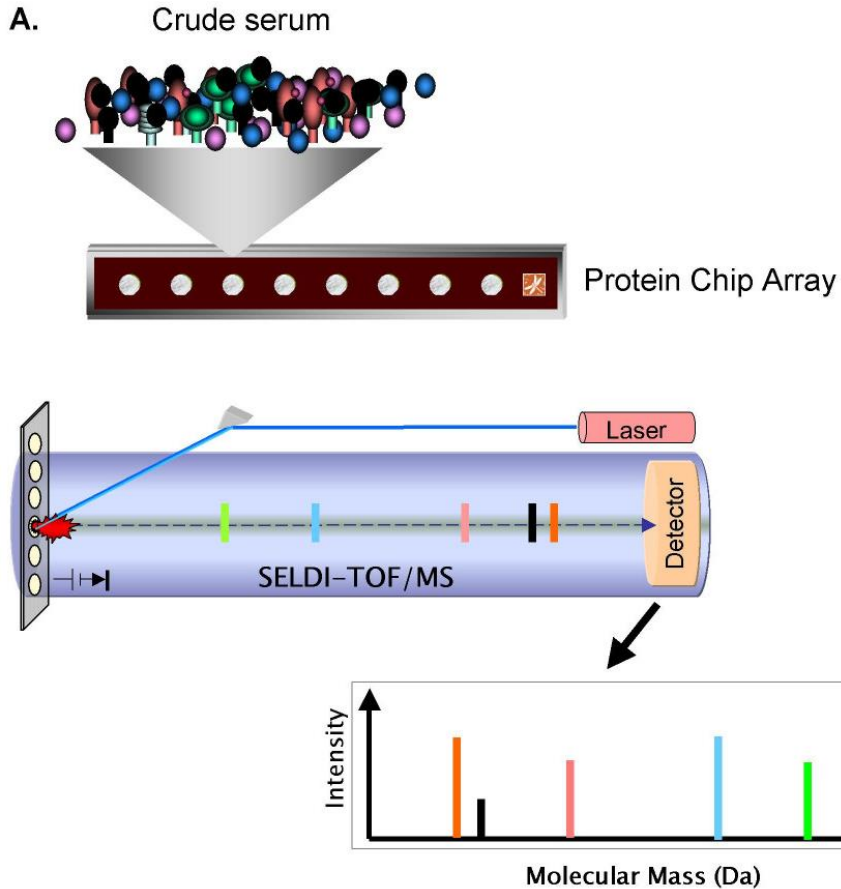
Biomarker: Definition

A characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biologic processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention.

NIH Biomarkers Definition Working Group.
Atkinson, et al. *Clin Pharmacol Ther* 2001



New diagnostics test Mass spectrometry



New diagnostic tools

Converting a phone into a microscope

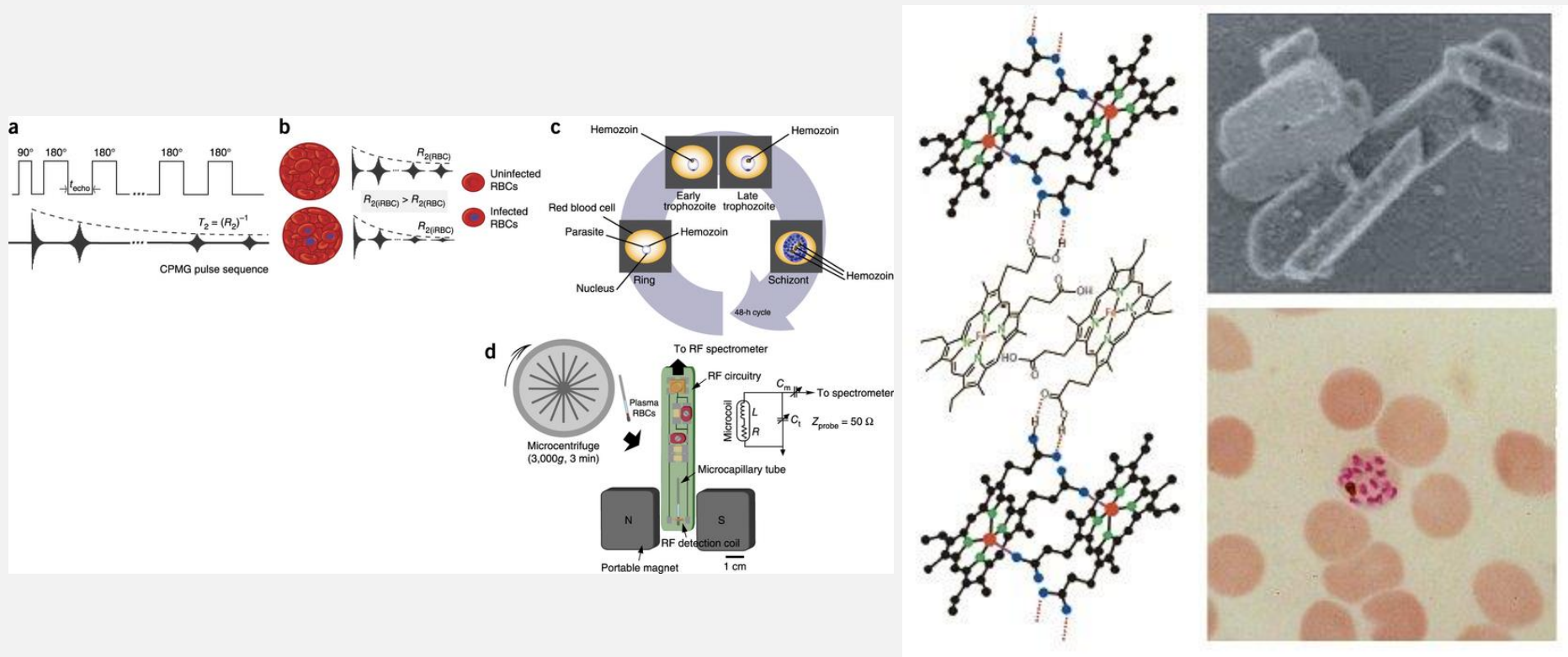


An app on the phone then takes a video of the magnified blood sample and uses an algorithm to look for movements in the fluid that match up with characteristics of *L. loa*. Based on this, the app accurately counts how many parasites are present.

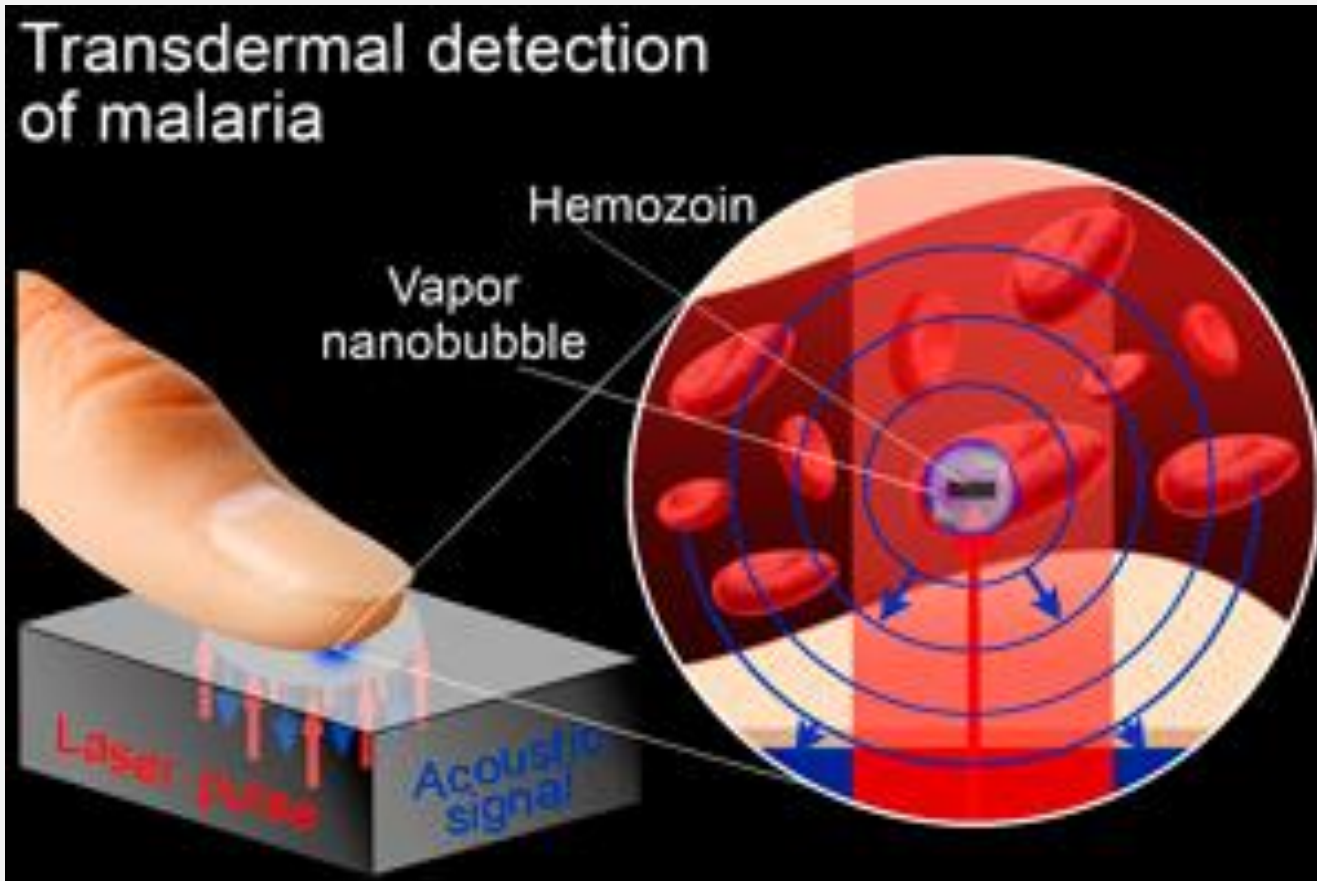
It requires simply loading a blood-containing capillary onto a 3D-printed plastic case containing a lens. The plastic shell slides over an iPhone, aligning the device's lens to its camera.

Quickly finding out whether patients infected with *O. volvulus* or *W. bancrofti* also have *L. loa* in their blood is important for deciding whether ivermectin can be safely administered.

Magnetic Resonant Relaxometry detects malaria biomarkers

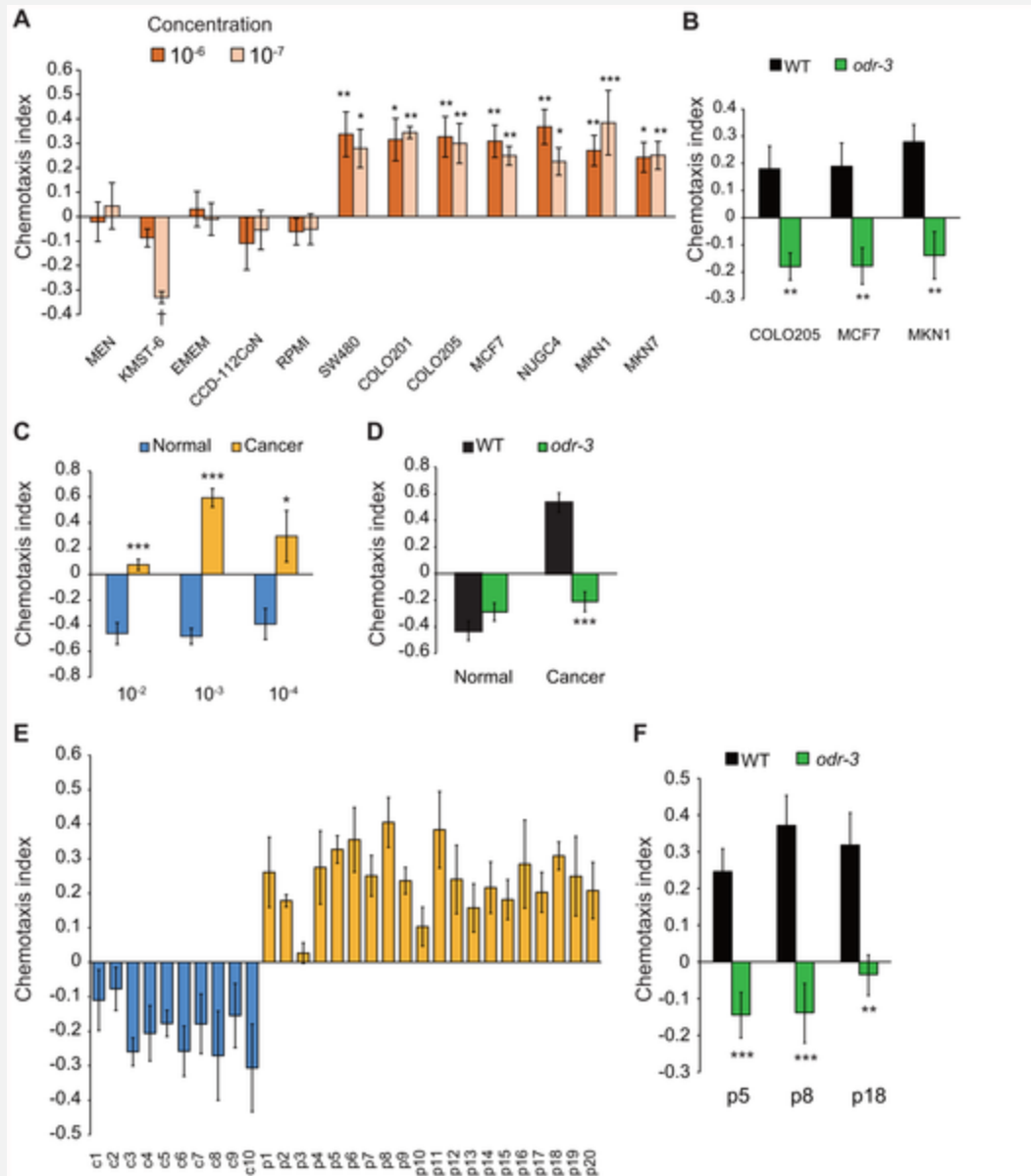


- Plasmodium parasite feeds on hemoglobin in red blood cells as the infection grows, which leads to the release of iron. The malaria parasite, in turn, converts this to hemozoin, which is a paramagnetic crystallite;
- Hemozoin can disrupt the normal magnetic spins of hydrogen atoms, and an outside magnetic device such as the MRR can identify the disruption and how bad it is, relying on a relatively small blood sample from a finger prick.



This graphic shows how a laser pulse creates a vapor nanobubble in a malaria-infected cell and is used to noninvasively diagnose malaria rapidly and with high sensitivity. Image: E. Lukianova-Hleb/Rice Univ.

C.elegans can detect cancer



“A Highly Accurate Inclusive Cancer Screening Test Using Caenorhabditis elegans Scent Detection.” PLOS One, 2015.