

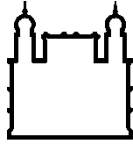
Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Medicina Tropical, IOC, Fiocruz

**Estudo da Estrongiloidíase Intestinal em Hospital
Universitário no Rio de Janeiro**

ANNA CARYNA CABRAL

Rio de Janeiro
Setembro de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

ANNA CARYNA CABRAL

Estudo da Estrongiloidíase Intestinal em Hospital Universitário no Rio de Janeiro.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina.

Orientadores:

Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa

Prof. Dra. Alena Mayo Iñiguez

Rio de Janeiro
Setembro de 2015

Cabral, Anna Caryna .

Estudo da Estrongiloidíase Intestinal em Hospital Universitário no Rio de Janeiro / Anna Caryna Cabral. - , 2015.

114 f.; il.

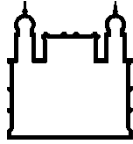
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.

Orientadora: Filipe Anibal Carvalho Costa.

Co-orientadora: Alena Mayo Iñiguez.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Estrongiloidíase. 2. Epidemiologia. 3. Imunossupressão. 4. Biologia molecular. 5. Reação em cadeia de polimerase. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: ANNA CARYNA CABRAL

Estudo da Estrongiloidíase Intestinal em Hospital Universitário no Rio de Janeiro.

.

ORIENTADORES:

Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa

Prof. Dr. Alena Mayo Iñiguez

Aprovada em: 30/09/2015

EXAMINADORES:

Prof^ª Dr^ª Dirce Bonfim de Lima - **Presidente**

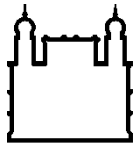
Prof^ª Dr^ª Cristiane da Cruz Lamas

Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Júnior

Prof. Dr. Maria José da Conceição

Prof. Dr. Luiz Henrique Conde Sangenis


Rio de Janeiro, 30 de setembro de 2015



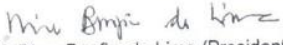
Ministério da Saúde

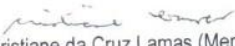
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

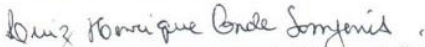
Ata que entregue pela SEAC já assinada.


 Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz


Ata da defesa de tese de doutorado em Medicina Tropical de **Anna Caryna Cabral**, sob orientação do Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa e da Dr^a. Alena Mayo Iñiguez. Ao trigésimo dia do mês de setembro de dois mil e quinze, realizou-se às quatorze horas, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: "**Estudo da Estrongiloidiase intestinal em Hospital Universitário do Rio de Janeiro**" no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Medicina - área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias, na linha de pesquisa: Infecções e Doenças produzidas por Helminthos. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Dirce Bonfim de Lima - UERJ/RJ (Presidente), Dr^a. Cristiane da Cruz Lamas - INI/FIOCRUZ ; Dr. Luiz Henrique Conde Sangenis - INI/Fiocruz; Dr^a. Maria José Conceição - UFRJ/RJ, Dr. Arnaldo Maldonado Junior - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr. Gustavo Albino Pinto Magalhães - UERJ/RJ e José Roberto Machado - UERJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Medicina está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr^a Martha Cecilia Suarez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 30 de setembro de 2015.

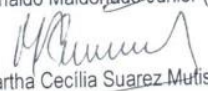

Dr^a. Dirce Bonfim de Lima (Presidente da Banca):


Dr^a. Cristiane da Cruz Lamas (Membro da Banca):


Dr. Luiz Henrique Conde Sangenis (Membro da Banca):


Dr^a. Maria José Conceição (Membro da Banca):


Dr. Arnaldo Maldonado Junior (Membro da Banca):


Dr^a Martha Cecilia Suarez Mutis (Coordenadora do Programa):

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360
Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: atendimento@seac@ioc.fiocruz.br Site: www.fiocruz.br/iocensino

**A Giovanna, por tudo que vem me ensinando ao longo dos seus 13
anos e por ter me tornado a cada dia uma pessoa melhor...**

**Ao Dr Filipe Anibal Carvalho Costa, por ser tornar presente nos
momentos necessários...**

AGRADECIMENTOS

À vida, pelas oportunidades concedidas, pelas dores amenizadas, pelos amores vividos, pelas saudades sempre renovadas...

Aos meus pais, pela vida, paciência e amor.

Aos meus pacientes, alunos e amigos pela paciência e pelos ensinamentos compartilhados.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da Fiocruz, pelo acolhimento nesses quatro anos.

Ao Laboratório de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz, em especial à Dra. Alena Mayo Iñiguez, pelo carinho e “puxões de orelha” na hora certa, e à Lucélia Guedes pela paciência com uma “médica” na bancada, e pela sua dedicação ao treiná-la...

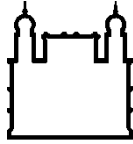
Ao Laboratório de Parasitologia do HUPE – UERJ pelo apoio na elaboração deste estudo.

Ao Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ, em especial à Dra Dirce Bonfim pelo apoio e exemplo profissional, e ao Dr. Márcio Neves Bóia pelos ensinamentos e por ter me tornado uma pessoa mais forte.

Ao Hospital Daniel Lipp, pela adrenalina que traz aos meus dias, em especial ao Dr Mario Novaes, ao Dr Artur Fonseca e à Claudinha.

Aos novos e velhos amigos, Camila, Cris Lamas, Domini, Giovanna, Rodrigo, Serginho.

**“ Prefiero morir de pie,...
a vivir arrodillado ”
(*Che Guevara*)**



Ministério da Saúde

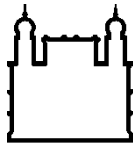
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTRONGILOIDÍASE: ESTUDO DA ESTRONGILOIDÍASE INTESTINAL EM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO NO RIO DE JANEIRO.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivos: i) descrever as características clínicas e epidemiológicas da estrogiloidíase intestinal em uma série de casos, ii) identificar condições clínicas de base e alterações hematológicas associadas, iii) comparar a efetividade de diferentes compostos benzimidazólicos utilizados para o tratamento, iv) caracterizar a infecção persistente por *S. stercoralis* em um grupo de pacientes, classificando as larvas obtidas como filarióides e rabditóides, procurando-se caracterizar a autoinfecção externa como perpetuadora da estrogiloidíase, v) analisar sequências nucleotídicas de fragmentos genômicos obtidos por PCR para confirmação e identificação de assinaturas genéticas específicas de cepas brasileiras. Foram realizados: i) estudo de série de casos para descrição clínico-epidemiológica de 267 casos, ii) estudo de caso-controle incluindo 167 casos e 133 controles, iii) comparação das taxas de negativação parasitológica em pacientes tratados com albendazol, mebendazol e tiabendazol, iv) pesquisa para obtenção e classificação de larvas de *S. stercoralis* em 11 pacientes com infecção persistente com uma média de 10,2 anos de duração, identificando suas características clínicas e v) estudo de taxonomia molecular com PCR e sequenciamento nucleotídico do gene ribossomal 18S de larvas obtidas. Entre os casos de estrogiloidíase, 74,3% eram do sexo masculino, 30,6% adultos jovens, 28,7% agricultores, 28,7% aposentados, 04% tinham doenças reumatológicas, 17,3% AIDS, 3,7% HTLV, 0,3% estavam em terapia imunossupressora. As doenças reumáticas estiveram significativamente associadas à estrogiloidíase (OR = 3,65, IC 95% = 1,02 – 13.11). As médias de eosinófilos foram $10,32 \pm 7,2\%$ no grupo de casos e $4.23 \pm 2.92\%$ no grupo de controles. As taxas de cura em pacientes que receberam tiabendazol e mebendazol foram 32/36 e 15/17, significativamente superiores ao albendazol (06/12). Entre 32 pacientes submetidos à reavaliação parasitológica, 11 mantinham infecção. Esquemas ineficazes de tratamento foram observados entre os pacientes com persistência da infecção, ao passo que a utilização da ivermectina e do tiabendazol por 05 dias foram observados nos casos sem infecção persistente. Apenas larvas rabditóides puderam ser recuperadas. As análises moleculares confirmaram que as larvas pertenciam ao gênero *Strongyloides*, descartando a infecção por *S. fuelleborni*, espécie capaz de infectar humanos, identificando assinaturas genéticas características de isolados brasileiros. O estudo conclui que i) a estrogiloidíase deve ser rotineiramente investigada em pacientes hospitalizados com condições complexas envolvendo comprometimento imunológico ou terapia imunossupressora, ii) há associação significativa com as doenças reumatológicas, iii) a infecção persistente pode ser frequentemente detectada anos após o diagnóstico inicial, sendo recuperadas apenas larvas rabditóides, de modo que a autoinfecção externa não parece ser o principal mecanismo da persistência parasitária nos casos estudados, iv) o albendazol é uma droga pouco eficaz e v) a detecção molecular de larvas pode ser aperfeiçoada para estudos mais abrangentes em epidemiologia molecular e genética evolutiva de *S. stercoralis*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

ABSTRACT

The present study had as objectives i) to describe the clinical and epidemiological features of intestinal strongyloidiasis in a case series, ii) to identify underlying diseases and associated hematological abnormalities, iii) to compare the efficacy of different benzimidazole compounds used in treatment, iv) to characterize *S.stercoralis* persistent infection in a patient group, classifying larvae as filariform or rhabditiform and to characterize external autoinfection as the cause of persistent strongyloidiasis, v) to analyze nucleotide sequences from genomic fragments obtained by PCR for confirmation and identification of specific genetic signatures from Brazilian strains. What was done: i) a case series study of 267 cases where the clinico-epidemiological were described, ii) a case-control study (167 cases and 133 controls), iii) a comparison of the proportion of negative stool examinations following treatment with albendazole, mebendazole and thiabendazole, iv) classification of *S. stercoralis* larvae obtained from 11 patients with persistent infection (mean duration of 10.2 years) evaluating associated clinical features v) study of the molecular taxonomy with PCR and nucleotide sequencing of the 18 S ribosomal gene of the obtained larvae. Patients presenting with strongyloidiasis were 74.3% male; 30.6% were young adults, 28.7% farmers, 28.7% retired, 4% had rheumatological disease, 17.3% had AIDS, 3.7% HTLV, and 0.3% were on immunosuppressive agents. Rheumatological disease was significantly associated with strongyloidiasis (OR = 3.65, CI 95% = 1.02 – 13.11). Mean eosinophil percent counts were $10.32 \pm 7.2\%$ in cases and $4.23 \pm 2.92\%$ in controls. Cure rate for thiabendazole and mebendazole were 32/36 and 15/17, significantly superior to albendazole (6/12). Of the 32 patients submitted to a parasitological reevaluation, 11 were still infected. Ineffective treatment regimens were seen in patients with persistent infection, while patients treated with ivermectin and thiabendazole for 5 days did not have persistent infection. Only rhabditiform larvae were recovered. Molecular analysis confirmed that larvae belonged to the *Strongyloides* genus, and infection by *S. fuelleborni*, a species potentially infective to humans, was not seen, and the genetic signature of Brazilian isolates was shown. The study concludes that: i) strongyloidiasis must be routinely investigated in hospitalized patients with complex underlying diseases involving immunosuppressive conditions or treatment, ii) there is significant association with rheumatological diseases, iii) persistent infection may be often detected years after the initial diagnosis and only rhabditiform larvae are recovered in this case, so that external autoinfection does not seem to be the main mechanism for persistence in the studied cases, iv) albendazole is little effective and v) the molecular detection of larvae may be improved for more comprehensive molecular epidemiological studies and evolutionary genetics of *S.stercoralis*.

ÍNDICE

| | |
|---|-------------|
| RESUMO | VIII |
| ABSTRACT | IX |
| 1 Introdução | 14 |
| 1.1 Dados históricos e epidemiológicos | 14 |
| 1.2 Morfologia do helminto | 15 |
| 1.3 Ciclo biológico | 17 |
| 1.4 Manifestações clínicas e complicações | 18 |
| 1.5 Diagnóstico laboratorial | 20 |
| 1.6 Tratamento e prevenção | 23 |
| 1.7 Justificativa | 24 |
| | |
| 2 Objetivos | 26 |
| 2.1 Objetivo Geral | 26 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 26 |
| | |
| 3 Material e Métodos | 27 |
| | |
| 4 Resultados | 33 |
| | |
| 5 Discussão | 57 |
| | |
| 6 Perspectivas | 67 |
| | |
| 7 Conclusões | 68 |
| | |
| 8 Referências Bibliográficas | 69 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Ciclo biológico do <i>S. stercoralis</i> (RSBMT, 2002) | 17 |
| Figura 2. Figura 2. Larvas rabditóides obtidas em exames de fezes (Baerman-Moraes) de pacientes com infecção persistente (A): amostra HPE 1. (B): amostra HPE 2. | 43 |
| Figura 3. Figura 3. Eletroforese em Gel de agarose a 3%, demonstrando resultados da PCR para detecção de <i>Strongyloides</i> sp. Pistas 1-8: alvo molecular 18S rDNA alvo1; 9-16: 28S rDNA. Pistas 1 e 9; HPE1.1; Pistas 2 e 10; HPE1.2; Pistas 3 e 11; HPE1.3; Pistas 4 e 12; HPE2.1; Pistas 5 e 13; HPE2.2; Pistas 6 e 14; HPE2.11; Pistas 7 e 15; Controle negativo da extração de DNA; Pistas 8 e 16; Controle negativo da PCR; M: Marcador de peso molecular 50pb (Invitrogen)..... | 48 |
| Figura 4. Fragmento de cromatograma na edição de sequências do alvo 28S rDNA de amostra HPE 1.1..... | 49 |
| Figuras 5A e 5B: Alinhamentos nucleotídico das sequências de <i>Strongyloides</i> sp. obtidas neste estudo com as sequências referências disponíveis no GenBank. A: alvo molecular do gene 18S rDNA; B: alvo molecular do gene 28S rDNA. As amostras do estudo estão identificadas como HPE. Sequências referências estão mostradas com o nome da espécie e o número de acesso do <i>GenBank</i> . As assinaturas genéticas estão em caixa vermelha..... | 51 |
| Figura 6: Árvores filogenéticas das sequências de <i>Strongyloides</i> do gene ribossomal 28S RNA obtidas no estudo. A. Árvore de NJ com modelo K2P B. Árvore ML com modelo K2P+I como gerado na análise. C. NJK2P. D. MLK2P. Amostras deste estudo HPE=SS. Sequências referências estão mostradas com o nome da espécie e o número de acesso do <i>GenBank</i> | 53 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 3.1 Primers e alvos moleculares utilizados no estudo | 31 |
| Tabela 4.1 Características dos 267 pacientes com estrogiloidíase intestinal em relação às comorbidades, corticoterapia e tratamento de escolha..... | 34 |
| Tabela 4.2. Doenças de base associadas com a estrogiloidíase intestinal não complicada no Rio de Janeiro, Brasil..... | 36 |
| Tabela 4.3 Contagem sanguínea de glóbulos brancos em pacientes com e sem estrogiloidíase intestinal não complicada no Rio de Janeiro, Brasil..... | 38 |
| . | |
| Tabela 4.4 Características dos pacientes com e sem infecção persistente por <i>Strongyloides stercoralis</i> | 41 |
| Tabela 4.5 Resultados da análise morfométrica das larvas isoladas das amostras de fezes dos pacientes HPE..... | 43 |
| Tabela 4.6. Resultados de concentração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento nucleotídico..... | 46 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS:

| | |
|---------------|---|
| CDC | Centers for Disease Control and Prevetion |
| DIP | Doenças Infecciosas e Parasitárias |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| ELISA | Enzime linked immunossorbent assay |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FUNASA | Fundação Nacional de Saúde |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| HTLV | Vírus linfotrópico da célula humana |
| HUPE | Hospital Universitário Pedro Ernesto |
| IFN- γ | Interferon-gama |
| IFI | Imunofluorescência indireta |
| IL | Interleucina |
| IOC | Instituto Oswaldo Cruz |
| LES | Lupus Eritematoso Sistêmico |
| LLTA | Leucemia/linfoma de células T |
| MS | Ministério da saúde |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PCR | Polimerase chain reaction |
| rRNA | Ribossomal RNA |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| SAF | Síndrome do anticorpo anti-fosfolípídeo |
| SIDA | Síndrome da imunodeficiência adquirida |
| TNF- α | Fator de Necrose Tumoral alfa |
| UDA | Unidade Docente Assistencial |
| UERJ | Universidade do Estado do Rio de Janeiro |
| WHO | World Health Organization |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dados históricos e epidemiológicos

A estrogiloidíase é uma helmintíase intestinal cuja infecção pode perdurar por décadas, ser assintomática, ou apresentar manifestações bastante variadas, desde a simulação de doença péptica até uma forma disseminada grave com elevada letalidade.

A doença é causada pelo nematódeo da espécie *Strongyloides stercoralis*, parasito descoberto em 1876 pelo médico francês Louis Normand, ao estudar fezes de soldados que haviam voltado com diarreia do serviço militar no Vietnã (Kozubsky, 2006). Alguns soldados vieram a falecer por conta do quadro diarreico e na necropsia dos mesmos foram encontrados vermes no intestino delgado, nos canais biliares e ductos pancreáticos. Imaginando se tratar de uma nova espécie, Bavay descreveu-os posteriormente com o nome de *Anguillula intestinalis*.

Em decorrência do complexo ciclo biológico, apresentando diferentes morfologias, o helminto recebeu diferentes nomenclaturas. Foi em 1902, que Stiles & Hassal o denominam *Strongyloides stercoralis* (em grego, “*Strongylos*” significa arredondado ou esférico) (Pires & Dreyer, 1993).

Este parasito é encontrado em quase todo o mundo, havendo relatos de casos em todos os continentes, com altas prevalências nas regiões de clima tropical (Andrade et al., 2010).

Calculam-se dentro de 300 milhões o número de pessoas parasitadas por algum helminto e em cerca de 150 mil os óbitos decorrentes de suas complicações (Costa, 2005). Estima-se, no mundo, uma frequência, variando por região, de 50 a 100 milhões de pessoas infectadas pelo parasito (Montes et al., 2010). Neumann et al. (2012) referem taxas de prevalência na América Latina e na África que podem chegar a 50%.

O Brasil tem altos índices desta parasitose, sendo que a frequência varia entre as localidades. A bacia do Rio Doce é a região de mais alta endemicidade. Na Bahia, encontra-se uma prevalência estimada de 8,8%, com taxas de infecção no Brasil de até 41,5% (De Paula et al., 2000; Neumann et al., 2012). Estudos realizados pela nossa equipe na região amazônica demonstraram taxas de prevalência de 4,2% em crianças em idade pré-escolar e 5,6 % na população geral,

utilizando metodologia adequada para identificação de larvas (Carvalho-Costa et al., 2007; Valverde et al., 2011). Estudo realizado em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico no Brasil detectou taxa de positividade de 1/75 (1,3%) (de Souza et al., 2015).

Estima-se em 30 milhões o número de pessoas infectadas por *Strongyloides stercoralis* no Brasil (Valverde et al., 2011).

1.2 Morfologia do Helminto

Existem seis formas evolutivas (Rey, 2011):

Fêmea paternogenética: Possui o corpo cilíndrico com aspecto filiforme longo, extremidade anterior arredondada e posterior afilada. Mede de 1,7 a 2,3 mm de comprimento por 0,03 a 0,04 mm de largura. Apresenta cutícula fina e transparente, levemente estriada no sentido transversal em toda extensão do corpo. Aparelho digestivo com boca contendo três lábios; esôfago longo, intestino simples terminando em ânus. Aparelho genital em disposição anfidelfa, ou seja, de lados opostos, com ovários, ovidutos e vulva que se comunica com o útero. Não há receptáculo seminal. A fêmea que coloca de 30 a 40 ovos por dia, é ovovivípara, pois elimina na mucosa intestinal o ovo já larvado.

Fêmea de vida livre: Possui aspecto fusiforme, com extremidade anterior arredondada e posterior afiada. Mede de 0,8 a 1,2 mm de comprimento por 0,05 a 0,07 mm de largura. Apresenta cutícula fina e transparente, com finas estriações. Aparelho digestivo simples, com boca contendo três lábios; esôfago com aspecto rabaditóide; o intestino é simples e de difícil observação, devido à presença dos órgãos genitais; terminando no ânus. Aparelho genital também anfidelfo, útero divergente, contendo até 28 ovos em diferentes graus de evolução. Apresenta receptáculo seminal.

Macho de vida livre: Possui aspecto fusiforme, com extremidade anterior arredondada e posterior recurvada ventralmente. Mede 0,7 mm de comprimento por 0,04 mm de largura. Boca com três lábios, esôfago tipo rabaditóide seguido de intestino terminando em cloaca. Aparelho genital contendo testículos, vesícula seminal, canal deferente e canal ejaculador, que se abre na cloaca. Presença de

dois pequenos espículos, auxiliares na cópula, que se deslocam sustentados por uma estrutura quitinizada denominada gubernáculo.

Ovos: São elípticos, de parede fina e transparente, praticamente idênticos aos do ancilostomídeos. Os da fêmea de vida livre são maiores, medindo 0,07 mm de comprimento por 0,04 mm de largura.

Larvas Rabditóides: O esôfago é do tipo rabditóide. As originárias das fêmeas parasitas são praticamente indistinguíveis das originadas das fêmeas de vida livre. Apresentam cutícula fina e hialina. Medem 0,02 a 0,03 mm de comprimento por 0,015 mm de largura. Apresentam vestíbulo bucal curto, cuja profundidade é igual ao diâmetro da larva, características que a diferenciam das larvas rabditóides de ancilostomídeos, em que o vestíbulo bucal é alongado e sua profundidade é igual ao diâmetro do corpo (10 μ m). O intestino termina em ânus afastado da extremidade posterior. Apresentam primórdio genital bem mais nítido em comparação com as larvas de ancilostomídeos. Nas formas disseminadas são encontradas na bile, no escarro, na urina, nos líquidos duodenal, pleural e cefalorraquidiano.

Larvas Filarióides: O esôfago é do tipo filarióide, longo, correspondendo à metade do comprimento da larva. Cutícula fina e hialina. Medem de 0,35 mm a 0,50 mm de comprimento por 0,01 mm a 0,03 mm de largura. Apresentam vestíbulo bucal curto e intestino terminado em ânus. A porção anterior é ligeiramente afilada e a posterior afina-se gradualmente, terminando em duas pontas, conhecida como cauda entalhada, que a diferencia das larvas filarióides de ancilostomídeos, que é pontiaguda. Essa é a forma infectante do parasito, capaz, portanto, de penetrar pela pele ou pelas mucosas; além de serem vistos no meio ambiente, também podem evoluir no interior do hospedeiro, ocasionando os casos de auto-infecção interna.

1.3 Ciclo biológico

São três as principais formas de transmissão do *S. stercoralis*: heteroinfecção, autoinfecção externa e autoinfecção interna. Na heteroinfecção, as larvas filarióides penetram através da pele e mucosa do hospedeiro. As larvas filarióides infectantes contam com a ação de metaloproteases, que auxiliam tanto na penetração quanto na migração das larvas pelos tecidos (De Bona & Basso, 2008).

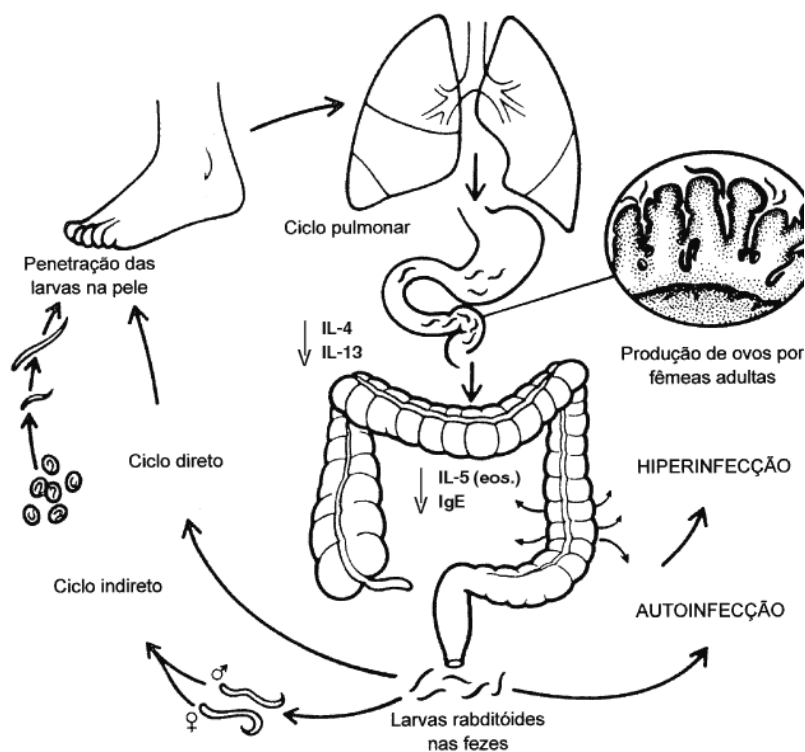


Figura 1: Ciclo biológico de *Strongyloides stercoralis* (RSBMT, 2002)

Na autoinfecção externa, as larvas rabditóides presentes na região perianal evoluem para a forma infectante, penetrando através da pele. Na autoinfecção interna, as larvas rabditóides podem evoluir para larvas filarióides infectantes ainda na luz intestinal (De Bona & Basso, 2008). A autoinfecção interna pode levar ao desenvolvimento de quadros graves de estrogiloidíase como a hiperinfecção e a disseminação do parasito (De Bona & Basso, 2008).

Em situações especiais, o ciclo de autoinfecção pode acelerar-se, levando à rápida elevação do número de vermes nos órgãos normalmente envolvidos no ciclo biológico, fenômeno conhecido como hiperinfecção (De Bona & Basso, 2008).

O aparecimento, tanto da estrogiloidíase disseminada, que é a elevação do número de parasitos nos órgãos que fazem parte do ciclo da doença e em órgãos também não-usuais, quanto da hiperinfecção, que é a aceleração anormal do ciclo do parasito levando um aumento da carga parasitária em órgãos do ciclo normal proporcionado pela auto-infecção interna. (Ribeiro et al., 2005; Andrade et al., 2010).

1.4 Manifestações clínicas e complicações

As manifestações agudas podem ocorrer precocemente no curso da infecção. Os sintomas observados são: eritema serpiginoso onde houve contato da larva com a pele, tosse mimetizando asma devido à migração da larva pelos pulmões, dor abdominal ou diarreia. (Luna et al., 2007)

É importante ressaltar que a estrogiloidíase disseminada, cuja letalidade chega a 87%, pode culminar no aparecimento de sepse por bactérias Gram negativas que atravessam a parede intestinal durante o ciclo do parasito, levando a casos graves e fatais se não rapidamente diagnosticada (Shorman, 2009).

Devido ao fato de que a maioria dos casos de doença disseminada estava associada à existência de outras condições que induziam alterações na resposta imunológica, surgiu a idéia de que as formas graves da estrogiloidíase estariam ligadas à desregulação da imunidade celular.

Fato de extrema importância foi a observação de que esses pacientes haviam sido submetidos à terapêutica com corticosteróides com as mais diversas finalidades, o que poderia, na verdade, proporcionar mudanças das características biológicas do helminto e não uma desregulação imune propriamente dita (Shorman, 2009). Yung et al., 2014 e Gonzalez-Ibarra et al., 2014 descreveram dois casos de hiperinfecção por *S. stercoralis* em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. O primeiro caso era um homem de 30 anos em uso de corticosteroides submetido a uma colectomia parcial cujo diagnóstico foi confirmado após identificação de numerosos helmintos durante o exame histológico da peça cirúrgica. O segundo era uma mulher de 36 anos em uso de corticosteroides e ciclofosfamida, que evoluiu com hemorragia alveolar difusa e conseqüente óbito, mesmo após tratamento com ivermectina.

Experimentos em animais sugerem que a resposta imune à infecção por *S. stercoralis* seja mediada por células T e B. As células T *helper* estimulam eosinófilos, produção de IgE, mastócitos e células caliciformes através da produção de

interleucinas (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13) e em situações em que o número de células T *helper* está diminuído, haveria maior probabilidade de hiper-infecção e doença disseminada (Genta, 1992; Shorman, 2009). A inibição de Th2, a imunidade humoral ou mediada por células da mucosa está associada com a hiperinfecção, que é mais freqüentemente visto em HTLV-1 do que em pacientes com HIV. Na AIDS, existe um aumento de citocinas Th2, enquanto que na infecção de HTLV-1, existe uma diminuição na resposta Th2, levando a um risco aumentado de auto-infecção. O uso de corticosteróides continua a ser o fator de risco mais comum para hiperinfecção.

Salles et al., 2013 em seus estudos relataram os baixos níveis de TNFa e IFNy em pacientes co-infectados com HTLV-1 e *S. stercoralis* com consequente aumento dos níveis de TNFa após o tratamento anti-helmíntico. Estes dados mostram que a infecção helmíntica tem um papel modulador da infecção por HTLV-1 e que *S. stercoralis* pode ser um co-factor no desenvolvimento de LLTA.

Os pacientes infectados pelo vírus linfotrópico de células T (HTLV-1) estão mais propensos à infecção por *S. stercoralis* e à evolução para formas graves de strongiloidíase. Isto ocorre por provável elevada produção de IFN- γ devido ao desvio da resposta imune para o tipo Th1, enquanto a proteção contra helmintos está associada à resposta do tipo Th2. Devido a este viés da resposta imune, indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam redução na produção de IL-4, IL-5, IL-13 e IgE, componentes participantes dos mecanismos de defesa contra *S. stercoralis* (Shorman, 2009). Furtado et al., 2013 descreveram em um Serviço de Medicina Tropical do Pará, uma frequência de 9% de *S. stercoralis* em pacientes com HTLV 1/2.

Mora et al., 2006 sugerem que a hiperinfecção por *S. stercoralis* pode exacerbar o lúpus eritematoso sistêmico e o SAF, predispondo a sepse por Gram-negativos e morte. Pacientes imunocomprometidos precisam de um diagnóstico precoce e tratamento específico, a hiperinfecção por esse helminto deve ser considerado no diagnóstico diferencial das complicações do LES.

A alta frequência de infecção por nematóides intestinais em pacientes com tuberculose pulmonar sugere que a imunomodulação induzida por helmintos pode facilitar a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e a progressão da doença. A imunossupressão pode também levar a reativação da tuberculose possivelmente devido a imunidade celular enfraquecida (Iwashita et al., 2013).

Quanto à associação do parasitismo por *S. stercoralis* com o alcoolismo crônico, Zago-Gomes e colaboradores, em 2002, demonstraram que existe uma maior frequência de infecção pelo parasito em etilistas crônicos. O alcoolismo gera um lento e progressivo comprometimento do organismo, o que pode ocasionar uma diminuição da resposta imune ao parasito, resposta esta mediada principalmente pelos linfócitos T, com uma redução da concentração de interleucina 4 (IL-4) e de interleucina 13 (IL-13), o que favoreceria a transformação das larvas rabditóides em larvas filarióides ainda dentro do organismo (De Bona & Basso, 2008).

Em se tratando de HIV e estrogiloidíase, diversos pesquisadores não encontraram associação entre essas duas doenças. Janssen et al., 2012 relataram o caso de um paciente com AIDS, mas com alta linfometria CD4, que evoluiu com hemoptise, perda de peso e diarreia fulminante. Ele foi diagnosticado com *Strongyloides stercoralis* e infecção humana do vírus T-linfotrópico (HTLV) tipo-1. Após o tratamento da estrogiloidíase sua contagem de células T-CD4 diminuiu muito. Portanto a contagem de células T-CD4 inicialmente elevadas foi equivocada e retardou o início da terapia anti-retroviral.

Izquierdo et al., 2013 discutiram em seu trabalho ao relatarem um caso fatal de hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis* em um paciente que recebeu transplante alogênico, os fatores de risco para hiperinfecção e disseminação que incluem a terapia com drogas imunossupressoras, o HTLV-1, o transplante de medula óssea e de órgãos sólidos, as doenças malignas hematológicas, a hipogamaglobulinemia e a desnutrição severa. O diagnóstico pode ser difícil, pois um único exame de fezes não consegue detectar larvas em até 70% dos casos, e os sintomas são inespecíficos. Apesar de eosinofilia ser um achado comum em pacientes com infecção crônica por esse helminto, é um indicador pouco confiável que pode estar ausente no momento do diagnóstico.

1.5 Diagnóstico Laboratorial

Exame Parasitológico de Fezes (EPF): O diagnóstico definitivo da estrogiloidíase é mediante a detecção de larvas nas fezes. A limitação desse método diagnóstico vem da quantidade de parasitos baixa em grande parcela dos casos.

Nenhum teste é considerado 100% sensível para o diagnóstico. A sensibilidade do diagnóstico aumenta para cerca de 50% se forem usadas três amostras fecais, podendo chegar perto de 100% com o uso de sete amostras (Rey, 2011).

Os parasitos adultos habitam o interior do tecido intestinal e não são detectáveis nas fezes. Nos casos de hiperinfecção e constipação intestinal, as larvas filarióides podem ser encontradas nas fezes. Algumas larvas rabditóides podem se transformar, espontaneamente, em larvas filarióides em amostras fecais não fixadas e conservadas à temperatura ambiente por algumas horas (Rey, 2011).

Várias são as técnicas descritas para o diagnóstico da estrogiloidíase por exame de amostras de fezes, entre as quais são mais comuns: exame direto com uso de solução salina e lugol, métodos de concentração de larvas como o Baermann modificado por Moraes (Moraes, 1948) e suas variações, métodos de concentração por sedimentação, cultura em placa de ágar e método de Harada-Mori (Harada & Mori, 1955).

Diagnóstico através de fluidos corpóreos: Diversos relatos da presença de larvas rabditóides ou filarióides de *S. stercoralis* já foram feitos em lavados broncoalveolares (Mayayo et al., 2005), escarro e fluido cérebro-espinhal principalmente em indivíduos sob corticoterapia.

A pesquisa de larvas em aspirados duodenais se mostrou bastante eficaz quando comparada à microscopia fecal em diversos estudos realizados que comparam esses espécimes clínicos. (Mayayo et al., 2005).

Diagnóstico Sorológico: As técnicas sorológicas, principalmente as imunoenzimáticas, podem ser uma boa alternativa (Rossi et al., 1993). O uso de antígenos heterólogos, ou seja, provenientes de larvas de outras espécies de *Strongyloides*, como *S. ratti* são de fácil obtenção e não representam risco para seus manipuladores. (Costa-Cruz et al., 2003; Rodrigues et al., 2004)

As principais técnicas sorológicas, que podem testar um grande número de amostras de soro em poucas horas são: ensaios imunoenzimáticos (Enzyme-linked Immunosorbent Assay - ELISA e Western-blot), imunofluorescência e teste de aglutinação em partículas de gelatina.

O método ELISA é considerado superior aos outros testes sorológicos, sua sensibilidade varia em torno de 85% a 95% e a especificidade pode chegar a 90% (Koosha et al., 2004).

O teste ELISA detecta a presença de anticorpos das classes de imunoglobulinas G, específicos para o parasito, mas não estabelece a carga parasitária, além dos frequentes falso-positivos causados pela reação cruzada com antígenos de outros nematóides, como por exemplo, ancilostomídeos e filarídeos (Sithithaworn et al., 2003).

Diagnóstico molecular: O diagnóstico laboratorial da estrogiloidíase baseia-se principalmente na detecção de larvas *Strongyloides stercoralis* pelo exame microscópico de amostras de fezes. Por ser pequeno o número de larvas presentes, especialmente em infecções crônicas, a taxa de detecção é baixa e múltiplas amostras devem ser examinadas com a finalidade diagnóstica. Além disso, a possibilidade de erro de identificação de larvas por microscopia não pode ser excluída em áreas endêmicas com outras parasitoses.

Em relação aos aspectos filogenéticos moleculares do *S. stercoralis* alguns estudos vem sendo realizados gerando informações sobre a variabilidade genética desse organismo e a sua possível influência no processo de infecção, por meio de detecção de polimorfismos de DNA, através de técnicas disponíveis no momento (Marra et al., 2010)

Recentemente, a detecção do DNA do parasito em amostras de fezes utilizando PCR em tempo real demonstrou alta sensibilidade e especificidade, utilizando uma grande variedade de controle de DNA e de amostras de fecais. O conjunto de primers e sonda a partir da sequência do gene 18S rRNA foi 10 vezes a 100 vezes mais sensível do que o PCR concebido a partir do citocromo c oxidase gene da subunidade I ou a S. (Kramme et al., 2011)

Na maioria dos países endêmicos este procedimento não será viável como uma ferramenta de diagnóstico de rotina em clínicas onde instalações laboratoriais são muitas vezes limitadas. Mas não podemos deixar de ressaltar como uma alternativa útil ao método de Baermann, oferecendo um aumento de duas vezes na taxa de detecção.

1.6 Tratamento e Prevenção

A infecção por *Strongyloides stercoralis* representa um grande desafio para os médicos nos países tropicais devido aos seus sinais e sintomas inespecíficos. Relatos dessa infecção em pacientes com hanseníase, lúpus eritematoso sistêmico

(LES), receptores de transplantes de órgãos e indivíduos e com desnutrição têm sido relatados na literatura (Mohanasundaram et al., 2012).

O tratamento da estrogiloidíase mudou significativamente desde que a administração por via oral de ivermectina estabeleceu-se como o tratamento de escolha. Esta medicação é mais bem tolerada, além de estar associada a maior erradicação de larvas do parasito em comparação ao albendazol. A administração de 200 µg/kg/dia de ivermectina por 1 a 2 dias, cura em até 97% dos casos a doença na sua forma intestinal.

Hunter, Petrosyan & Asch, 2008 descreveram um caso de uma mulher, 38 anos, imunocomprometida com lúpus eritematoso sistêmico em uso de prednisona, azatioprina e a hidroxicloroquina que desenvolveu doença disseminada mesmo após iniciado o tratamento com albendazol. O sucesso no tratamento foi com o início subsequente de ivermectina.

O estudo prospectivo de Suputtamongkol et al., 2011 realizado no Hospital Siriraj, Bangkok, Tailândia confirma que tanto uma dose única, como uma dose dobrada de ivermectina oral com intervalo de duas semanas, se mostrou mais eficaz do que um curso de sete dias de dose máxima de albendazol em pacientes com diagnóstico de *S.stercoralis*. Inclusive, a dose dupla de ivermectina, tomada com duas semanas de intervalo, se apresentou mais eficaz do que uma dose única nesse grupo de pacientes.

Contudo, uma grande limitação esta relacionada às formas disseminadas da doença, nas quais frequentemente apresentam lesões nos vasos linfáticos intestinais e na mucosa intestinal pelo próprio parasita. Esses fatores somados causam edema na parede intestinal, redução da absorção e íleo, resultando em prejuízo da absorção do anti-helmíntico. O licenciamento de anti-helmínticos parenterais seria de grande valor nesses casos em particular.

A melhor estratégia de prevenção das formas graves é identificar e tratar pacientes infectados e os de “alto risco” antes de iniciar imunossupressores por conta, na maioria dos casos, de neoplasias. Em estudo recente, a maioria dos pacientes que apresentaram estrogiloidíase disseminada utilizou altas doses de corticóide por mais de três semanas e estavam em tratamento com quimioterapia e radioterapia em decorrência de neoplasia hematológica. Todos esses pacientes haviam recebido profilaxia com albendazol. O estudo de Nucci e col. em 1995 sugeriu não haver benefício no uso de anti-helmínticos como profilaxia em pacientes hematológicos, falha esta que pode ser decorrente da baixa eficácia do albendazol.

Santiago & Leitão, 2009 fizeram uma revisão utilizando o Banco de Dados MEDLINE com objetivo de encontrar na literatura evidências sobre a profilaxia de estrogiloidíase nos pacientes imunossuprimidos com doenças reumatológicas. Nessa revisão os autores concluíram que a ivermectina tem o melhor perfil de segurança, menor custo e melhor eficácia, e deverá ser a droga de escolha para a profilaxia em tais pacientes. Embora um regime profilático definitivo não tenha sido definido, a opção de 200 mcg / kg / dia durante 2 dias, repetidos no prazo de 2 semanas, parece ser a melhor opção. Tais regimes devem ser repetidos a cada 6 meses em caso de persistência da imunossupressão.

Aspectos ligados à profilaxia da estrogiloidíase permanecem controversos e merecem ser estudados, com a finalidade de beneficiar os pacientes com deficiência de imunidade celular e aqueles que serão submetidos a esquemas terapêuticos que resultem em imunossupressão grave, especialmente em áreas endêmicas.

1.7 Justificativa

Sabemos que muitos são os aspectos ligados a estrogiloidíase que não foram estudados. Um melhor entendimento desses mecanismos pode resultar em descobertas de relevância clínica e epidemiológica. Este estudo envolve investigações sobre a estrogiloidíase, uma doença que possui características muito peculiares. Tivemos a oportunidade de acompanhar mais de 250 pacientes com diagnóstico de estrogiloidíase, alguns por um período superior a 10 anos.

Pretendeu-se investigar, i) fatores associados à aquisição da infecção e à perpetuação da infecção por longos períodos, ii) a interação com outras doenças infecciosas e não infecciosas, iii) a efetividade de diferentes esquemas terapêuticos em um grupo de casos, iv) características moleculares dos isolados.

A seguir, fazemos uma síntese de aspectos que julgamos mais relevantes em relação ao parasito e à infecção:

- *Strongyloides stercoralis* é um dos poucos parasitos intestinais que têm a capacidade de multiplicar-se no organismo determinando formas extremamente graves, contribuindo inclusive para a grande longevidade da infecção, que pode durar por décadas.

- A infecção é um protótipo da resposta Th2 e tem sido associada à desregulação de outras infecções, dentre elas a paracoccidiodomicose, a infecção pelo HTLV e a tuberculose.

- A inexistência, até o momento, de uma droga altamente eficaz para tratamento e de uma padronização de controle de cura faz necessário o estudo da efetividade dos diferentes esquemas terapêuticos

- Desconhecem-se os fatores que colaborariam para uma provável evolução para a forma disseminada grave

- A sensibilidade dos métodos convencionais de exames parasitológicos de fezes para o diagnóstico de estrogiloidíase é baixa.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais associados à estrogiloidíase intestinal.

2.2 Objetivos Específicos

Identificar as doenças de base associadas à estrogiloidíase intestinal em pacientes atendidos em hospital terciário

Descrever as características epidemiológicas dos pacientes com estrogiloidíase intestinal

Descrever as alterações hematológicas associadas à estrogiloidíase intestinal

Comparar a efetividade de diferentes esquemas terapêuticos utilizados para o tratamento da estrogiloidíase intestinal

Caracterizar a infecção crônica e os estádios evolutivos das larvas de *Strongyloides stercoralis* isoladas em um grupo de pacientes incluídos no estudo

Identificar características genéticas, através de reação em cadeia da polimerase (PCR) dos isolados de *Strongyloides stercoralis*, obtidos de um grupo de pacientes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais de estudo

A investigação com pacientes – incluindo o estudo de série de casos e o estudo de caso-controle – foi desenvolvida no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). O HUPE possui 400 leitos com todas as especialidades médicas curriculares da Faculdade de Medicina e serve como local de ensino para os cursos de graduação e pós-graduação da área de saúde da UERJ. O local de estudo foi a Unidade Docente Assistencial (UDA) de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP), composta conjuntamente pela disciplina e pelo serviço de DIP, onde são ministrados o curso do quarto ano médico, o internato e a residência médica em DIP. O setor é composto por três enfermarias com um total de quinze leitos, dois quartos de isolamento e cinco ambulatórios.

As análises parasitológicas de morfologia das larvas para identificação dos estágios evolutivos e os estudos de filogenética molecular foram feitas no Laboratório de Parasitologia do HUPE e Laboratório de Biologia de Tripanossomatídeos (LABTRIP) IOC- Fiocruz RJ. As análises de dados foram realizadas no Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular do IOC – Fiocruz.

3.2 Desenho dos estudos:

3.2.1 Estudo de série de casos

Os 267 casos de estrogiloidíase foram identificados a partir dos resultados de exames parasitológicos de fezes, realizados no Laboratório de Parasitologia do HUPE de 1998 a 2012. Foram considerados infectados os pacientes que tiveram identificadas, no exame parasitológico de fezes, larvas rabditóides e/ou filarióides compatíveis morfologicamente com *S. stercoralis*. Os casos de estrogiloidíase foram diagnosticados através da técnica de Baerman-Moraes. Estes pacientes estavam vinculados a diversos serviços e enfermarias do HUPE, sendo portadores de diversas doenças de base (a maioria crônicas), sendo o exame parasitológico de fezes solicitado como rotina laboratorial.

As informações sobre as doenças de base, os medicamentos utilizados (dentre eles os corticosteróides), o tratamento utilizado para a estrogiloidíase e os resultados dos exames laboratoriais dos pacientes foram obtidos consultando os prontuários médicos do HUPE/UERJ. Estas informações foram transpostas para um questionário especificamente construído para ser utilizado na elaboração de um banco de dados no programa Epiinfo versão 3.5.1. Neste questionário constavam as seguintes variáveis: sexo, idade, raça, estado civil, profissão, escolaridade, naturalidade, residência atual, histórico de trabalho na agricultura, parasitos associados, doenças associadas, uso de corticoide (dosagem e tempo de uso), esquema de tratamento, hemograma antes e após o tratamento, controle de cura. No estudo de série de casos foram descritas as frequências das características clínicas e epidemiológicas de 267 casos de estrogiloidíase intestinal. Os pacientes foram contatados e convidados a participar do estudo. Aqueles que concordaram em participar foram encaminhados, após assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para acompanhamento também no ambulatório de DIP (HUPE/UERJ) onde realizaram outros três exames parasitológico de fezes e fizeram nova coleta de sangue venoso periférico para exames sorológicos e hemograma.

3.2.2 Estudo de caso-controle

Os casos de estrogiloidíase identificados no HUPE entre os anos 1998 e 2012 foram pareados por idade a um grupo controle, com exame negativo, selecionado no livro de registro do Laboratório de Parasitologia do HUPE. Foi possível compor o grupo controle com 133 pacientes negativos para *S. stercoralis*, que foram comparados com 167 casos de estrogiloidíase que tinham a doença de base bem caracterizada e dados de prontuários completos, atingindo-se uma razão de casos e controles de 0,8:1. Os pacientes selecionados como controles tiveram seus prontuários médicos examinados, para obtenção de dados relativos à doença de base, exames laboratoriais, idade e sexo. As diversas doenças de base identificadas em casos e controles foram agrupadas em i) infecção pelo HIV, ii) infecção pelo HTLV, iii) doenças cardio-vasculares, iv) diabetes, v) doenças respiratórias obstrutivas, vi) hepatites virais, vii) tuberculose, viii) câncer, ix) doença renal crônica, x) doenças nutricionais e metabólicas, xi) doenças reumáticas e xii) doenças dermatológicas. Entre as doenças cardiovasculares, incluíram-se pacientes com angina de peito, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio. Entre os casos de doenças obstrutivas respiratórias havia pacientes com

asma e doença pulmonar obstrutiva crônica. Os pacientes com hepatites virais incluíram casos de hepatite B e hepatite C. Os casos de tuberculose estavam distribuídos nas formas pulmonar, óssea e ganglionar. Os pacientes com câncer incluíram casos de linfoma, mieloma múltiplo, neoplasia de colo de útero, de cólon, de estômago, de pâncreas, de pulmão e de próstata. As doenças metabólicas incluíram dislipidemia, hipotireoidismo e obesidade. Os quadros psiquiátricos incluíram depressão, esquizofrenia e ansiedade. Entre os pacientes com doenças reumáticas havia casos de lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, gota, esclerodermia, doença de Behçet, síndrome de Sjögren, psoríase e eczema. As frequências de acometimento pelos diferentes grupos de doenças foram comparadas nos grupos de casos e de controles.

Foram calculadas razões de chance (OR, odds ratios) e seus respectivos intervalos de confiança de 95%. O nível de significância estatística foi estipulado em $p < 0,05$. Foi realizada análise bi e multivariada. A análise multivariada foi realizada para controlar a variável sexo, para cada grupo de doenças.

3.2.3 Comparação da efetividade de diferentes esquemas terapêuticos utilizados

A droga ivermectina, considerada de primeira escolha para o tratamento da strongiloidíase, não era disponível para uso humano quando a maioria dos pacientes do estudo foi diagnosticados positivos para esta parasitose.

Desta forma, o tratamento da strongiloidíase, na década de 1990 e início do século 20, era feito usualmente com compostos benzimidazólicos, como albendazol, mebendazol e tiabendazol. Em 65 pacientes foram realizados tratamentos com diferentes benzoimidazólicos. Estes pacientes foram divididos em três grupos: i) 36 pacientes receberam tiabendazol 1500 mg / dia, durante cinco dias, ii) 12 pacientes receberam albendazol 400 mg / dia durante três dias e iii) 17 pacientes receberam mebendazol 200 mg / dia durante três dias. As taxas de cura foram comparadas nos três grupos, utilizando-se o teste do qui-quadrado, com significância estatística de 5%.

3.2.4 Caracterização da infecção crônica por *Strongyloides stercoralis* e fatores associados

Os 267 pacientes com estrogiloidíase diagnosticados entre os anos 1998 e 2012 foram convidados a retornar ao HUPE para repetição de três exames parasitológicos de fezes em intervalos regulares com o objetivo de caracterizar a infecção crônica por *S. stercoralis*. Foi possível recrutar, deste total, 32 pacientes, que foram novamente avaliados e reexaminados com 03 amostras fecais em dias alternados (primeiro, terceiro e quinto dia). Além do método de Baerman-Moraes, análises coproparasitológicas adicionais pelas técnicas de Kato-Katz (Kato 1960) e Faust (Faust et al. 1938) foram realizadas no intuito de complementar o diagnóstico para outras parasitoses intestinais que por ventura poderiam ser encontradas. A contagem e a análise morfológica das larvas, que foram classificadas em rabaditóides/ filarióides, foram realizadas em todas as lâminas positivas. As larvas foram isoladas com micropipeta em solução aquosa de glicerol 50% e fotografadas utilizando Canon A650 IS. As imagens foram editadas no programa Image J 1.44p (National Institutes of Health – 96 USA). A análise morfométrica das larvas foi realizada em microscópio de luz utilizando ocular milimetrada.

Entre os pacientes que puderam ser avaliados quanto à infecção crônica, seis tinham HIV/aids como doença de base, quatro tinham doenças reumatológicas como lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide, dois tinham hepatite C, um tinha infecção pelo HTLV, um apresentava paracoccidiodomicose e um tinha tuberculose. Os demais eram portadores de diversas condições clínicas como úlcera péptica, hipertensão arterial, glaucoma, entre outras. Estes pacientes tinham idade entre 11 e 74 anos e 44 anos, tendo sido diagnosticados com estrogiloidíase intestinal pela primeira vez entre os anos de 1999 a 2011. Desta forma, o tempo de seguimento médio foi de 4 a 16 anos, com média de 10,4 anos. Os pacientes identificados como positivos na reavaliação foram tratados com dose ivermectina na dose de 200 mcg por kg de peso corporal via oral.

3.2.5. Análise Molecular

As larvas isoladas foram armazenadas a seco em tubos do tipo Eppendorf e congeladas até o momento da extração de DNA. As amostras positivas para *S. stercoralis* foram submetidas à análise molecular.

O DNA das amostras de larvas foi extraído utilizando o Kit comercial QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen), de acordo com instruções do fabricante com modificações. Foi utilizada 60 µL de Proteinase K a 20mg/mL (Invitrogen) e durante a etapa de eluição um volume de 60µl e incubação de 15 minutos. As concentrações

foram estimadas a 260nm de absorvância em espectrofotômetro Pico200 (Picodrop™). O DNA foi purificado quando necessário utilizando *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada utilizando os alvos moleculares descritos na Tabela 4.1.

Tabela 3.1: Primers e alvos moleculares utilizados na análise molecular

| Alvos | Primers | Sequencia (5´-3´) | Tamanho | Referências |
|-------------|--|---|---------|----------------------|
| 28S rDNA | StroS StroAS | TTAGAGTCGTGTTGCTTGGAA- GTGCAACTGGCTCTGTATGC | 180pb | Kramme et al., 2011 |
| 18S rDNA-A1 | Stro18S- 1530F Stro18S- 1630R | GAATTCCAAGTAAACGTAAGTCATT AGC TGCCTCTGGATATTGCTCAGTTC | 101pb | Verweij et al., 2009 |
| 18S rDNA-A2 | SSUA SSU22R | AAAGATTAAGCCATGCATG GCCTGCTGCCTTCCTTGGA | ~400pb | Dorris et al., 2002 |

pb: Pares de bases

Dois alvos moleculares foram aplicados para o gene 18S rDNA (Tabela 4.1). A reação de PCR para o alvo 1 (18S rDNA-A1) do gene ribossomal DNA (rDNA) 18S consistiu em um volume final 25µl, e contém 2,5 mM MgCl₂, 100ng de cada primer, 1U de Platinum *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 1X de Buffer, 0,2mM de dNTPs, 5µl ou 50-100ng/ µl de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador Esco Swift MaxPro programado para iniciar o ciclo de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 57°C e 40 segundos a 72°C, e extensão de 7 minutos a 72°C. Para o alvo2 (18S rDNA-A2) do gene ribossomal 18S rDNA foram aplicadas as condições da PCR descritas acima com exceção de 150ng de cada primer e 2,5U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), em um volume final de 50µl. O termociclador foi programado para iniciar o ciclo de desnaturação de 3 minutos a 96°C, seguido de 40 ciclos de 40 segundos a 96°C, 40 segundos a 55°C e 40 segundos a 72°C, e extensão de 8 minutos a 72°C. As condições de reação e ciclagem da PCR para do gene ribossomal 28S rDNA foram as descritas para o alvo 1 do gene 18SrDNA.

A eletroforese foi realizada em gel de Agarose 2-3% seguido de uma coloração com brometo de etídio a 0,5µg/ml. Posteriormente os géis foram visualizados utilizando luz UV no transluminador UVP (Gel Logic – 212 PRO – Carestream). Os produtos de PCR foram purificados utilizando *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Health Care). As reações de sequenciamento de DNA foram realizadas utilizando o Big Dye terminator v 3.1 kit (Applied Biosystems) a Plataforma de Sequenciamento PDTIS/Fiocruz (sequenciador Applied Biosystems ABI 3730).

As análises das sequências foram realizadas utilizando os programas SeqMan v. 7.00 -DNASTAR Lasergene (Madison Wisconsin, EUA), BioEdit v. 7.0.4. (Department of Microbiology, North Carolina State University) Clustal X v. 1.83 (Thompson *et al*, 1997) e MEGA6 – Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 - (Tamura *et al*, 2013).

As sequências obtidas dos isolados brasileiros de *S. stercoralis* que foram geradas neste estudo foram depositadas no banco internacional de sequências GenBank.

3.2.5. Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do HUPE (CEP/HUPE), licença 2789/2010; CAAE: 0234.0.228.011-10 **(Anexo 1)**.

4. Resultados

4.1. Estudo de série de casos

A casuística incluiu 267 casos de estrogiloidíase intestinal. As idades variaram de três a 83 anos, predominando os adultos jovens (61/267 [30,6%]). Os casos, em sua maioria, residem nos bairros da zona oeste do município do Rio de Janeiro (90/267 [41,9%]). A frequência do sexo masculino foi maior (n=201, 74,3%) e o histórico de atividade ligada à agricultura estava presente em 78 pacientes (28,7%). Entre os casos, 261 (98,1%) são brasileiros e 73 (27,3%) têm como escolaridade apenas o 1º grau incompleto. Visto que o estudo foi realizado no Rio de Janeiro, a naturalidade predominante foi a fluminense (n=171, 63,2%). Quando questionamos a profissão das pessoas com estrogiloidíase, nos chamou atenção que 42 (16,8%) deles estavam aposentados, o que sugere a longevidade da infecção por este helminto, que em 189 (77,1%) dos exames parasitológicos de fezes foi identificado sem associação com algum outro parasito.

Na Tabela 4.1, observamos que as neoplasias são doenças presentes em portadores desse helminto. Estes pacientes, mesmo em uso de corticoterapia não evoluíram para disseminação da parasitose. Demonstrem-se também outras doenças presentes em pacientes com estrogiloidíase, que mesmo em uso de corticoterapia sem tratamento prévio da parasitose não apresentaram disseminação para outros órgãos e tecidos.

Entre os 208 casos em que foi realizado hemograma imediatamente antes do tratamento helmintíase, o percentual de eosinófilos variou de 0 a 49,1%. Na ocasião, 145 pacientes (69,7%) estavam com contagem absoluta e proporcional de eosinófilos acima da normalidade. Entre os 125 casos que realizaram um hemograma prévio àquele realizado antes do tratamento, o percentual de eosinófilos variava entre 0,1% a 72,9%, 82 (69,6%) estavam com contagem elevada.

Dos 74 pacientes com diagnóstico de estrogiloidíase intestinal não-complicada, 65 foram divididos em três grupos que receberam os tratamentos subsequentes : i) de 36 pacientes recebeu tiabendazol 1500 mg / dia , durante cinco dias , ii) 12 pacientes receberam albendazol 400 mg / dia durante três dias , e iii) 17 pacientes receberam mebendazol 200 mg / dia durante três dias .

Taxas de negatificação do exame de fezes pela técnica Baerman - Moraes foram: i) 32/36 (90%) entre os pacientes do grupo tiabendazol; ii) 06/12 (50 %) entre

os pacientes do grupo de albendazol e , iii) 15/17 (88%) entre os pacientes que receberam o mebendazol.

Tabela 4.1: Características dos 267 pacientes com estrogiloidíase intestinal em relação às comorbidades, corticoterapia e tratamento de escolha.

| Característica | n (%) |
|------------------------------|--------------|
| Doenças associadas | |
| SIDA/AIDS | 47(17,3%) |
| Tuberculose | 29 (10,7%) |
| Neoplasia | 25 (9,25%) |
| Asma | 19 (7,0%) |
| Doença gastrointestinal | 18 (6,6%) |
| Doença reumatológica | 11 (4,0%) |
| HTLV | 10 (3,7%) |
| Cirrose hepática | 06 (2,2%) |
| Paracoccidioidomicose | 04 (1,4%) |
| Outras doenças | 98 (36,2%) |
| Corticoterapia | |
| Não fez uso | 232 (86,8%) |
| Antes do tratamento | 18 (6,7%) |
| Após o tratamento | 06 (2,2%) |
| Fez uso sem o tratamento | 02 (0,7%) |
| Fez uso durante o tratamento | 01 (0,3%) |
| Ignorado | 08 (2,9%) |

4.2 Estudo de caso-controle

As doenças reumáticas foram associadas com estrogiloidíase intestinal através da análise bivariada (OR = 3.65, 95% CI = 1.02-13.11, p = 0.028) (Tabela 4.2). Após controle dos gêneros usando regressão logística (masculino/feminino, OR = 2.58, 95% CI = 1.57-4.24, p <0.001), as doenças reumáticas permaneceram significativamente associados com a estrogiloidíase intestinal (OR = 4.96, 95% CI = 1.34 to 18.37, p = 0.0163). Em relação a contagem dos glóbulos brancos, os pacientes com estrogiloidíase demonstraram maior quantidade de eosinófilos (10.32% ± 7.2% vs 4.23 ± 2.92, p <0.001) e proporcional de monócitos (8.49% ± 7.25 vs 5.39 ± 4.31%, p <0.001). Além disso, pacientes com *S. stercoralis* apresentam menor taxa de neutrófilos (52.85% ± 15.31 vs 61.32% ± 11.4; p < 0.001) e linfócitos (28.11% ± 9.72 vs 30.90 ± 9.51%, p = 0.009) do que os controles (Tabela 4.3).

Tabela 4.2. Doenças de base associadas com a estrogiloidíase intestinal não complicada no Rio de Janeiro, Brasil

| | Casos (n=167) | Controles (n=133) | OR (95%CI) | 95% Intervalo de confiança (CI) | p-valor |
|---|------------------|-------------------|------------|---------------------------------------|---------|
| HIV/ AIDS | 40 (24) | 25 (18.8) | 1.3606 | 0.7759 - 2.3861 | 0.174 |
| HTLV | 14 (8.4) | 12 (9) | 0.9227 | 0.4116- 2.068 | 0.501 |
| Doença cardio – vascular ^a | 27 (16.2) | 46 (34.6) | 0.3648 | 0.2114- 0.6293 | <0.001 |
| Diabetes | 08 (4.8) | 04 (3) | 1.6226 | 0.4778 - 5.51 | 0.317 |
| Doença Respira- tória ^b | 11 (6.6) | 08 (6) | 1.1018 | 0.4301- 2.8223 | 0.517 |
| Hepatite viral ^c | 11 (6.6) | 03 (2.3) | 3.0556 | 0.8347- 11.1856 | 0.064 |
| Tubercu- lose ^d | 10 (6) | 04 (3) | 2.0541 | 0.6295– 6.7031 | 0.174 |
| Neopla- sias ^e | 17 (9.9) | 10 (5.2) | 1.394 | 0.616 – 3.1546 | 0.277 |

| | | | | | |
|--|----------|----------|--------|--------------------|--------|
| Doença renal crônica | 05 (3) | 0 (0) | - | - | NA |
| Desordem nutricional/metabólica ^f | 03 (1.8) | 08 (6) | 0.2858 | 0.0743- 1.0994 | 0.0052 |
| Distúrbios psiquiátricos ^g | 03 (1.8) | 06 (4.5) | 0.3872 | 0.095 – 1.5783 | 0.152 |
| Doenças reumatólogicas ^h | 13 (7.8) | 03 (2.3) | 3.658 | 1.0202 - 3.1161 | 0.028 |
| Doenças dermatológicas ⁱ | 05 (3) | 04 (3) | 0.9954 | 0.2619– 3.7824 | 0.625 |

^a 61 hipertensão arterial, 7 angina pectoris, 4 insuficiência cardíaca congestiva, 1 infarto agudo do miocárdio; ^b 8 asma, 11 doença pulmonar obstrutiva crônica; ^c 6 hepatite B, 8 hepatite C; ^d 12 tuberculose pulmonar, 1 tuberculose óssea, 1 tuberculose ganglionar; ^e 5 linfoma, 1 mieloma múltiplo, 1 neoplasia de útero, 1 neoplasia de cólon, 1 neoplasia de esôfago, 1 neoplasia de estômago, 2 neoplasia de laringe, 1 neoplasia de pâncreas, 3 neoplasia de próstata, 11 neoplasia de pulmão; ^f 5 dislipidemia, 3 hipotireoidismo, 3 obesidade; ^g 6 depressão, 2 esquizofrenia, 1 ansiedade; ^h 6 lupus eritematoso sistêmico, 3 artrite reumatoide, 3 gota, 2 esclerodermia, 1 doença de Behcet, 1 síndrome de Sjogren; ⁱ 5 psoríase, 4 eczema.

Tabela 4.3 Contagem sanguínea de glóbulos brancos em pacientes com e sem estrogiloidíase intestinal não complicada no Rio de Janeiro, Brasil

| | Casos (n=167) | Controles (n=133) | p-valor |
|---|---------------|-------------------|---------|
| Contagem total de glóbulos brancos no sangue X 1000 | 7.945 ± 2.980 | 8.052 ± 3.375 | 0.3008 |
| Neutrófilos não segmentados (%) | 1.70 ± 3.33 | 1.19 ± 1.58 | 0.1674 |
| Neutrófilos segmentados (%) | 52.85 ± 15.31 | 61.32 ± 11.4 | <0.001 |
| Eosinófilos(%) | 10.32 ± 7.2 | 4.23 ± 2.92 | <0.001 |
| Linfócitos(%) | 28.11 ± 9.72 | 30.90 ± 9.51 | 0.009 |
| Monócitos(%) | 8.49 ± 7.25 | 5.39 ± 4.31 | <0.001 |

4.3 Comparação da efetividade de diferentes compostos benzoimidazólicos para tratamento da estrogiloidíase intestinal

As taxas de negatização do exame de fezes pela técnica Baerman - Moraes foram: i) 32/36 (90%) entre os pacientes do grupo tiabendazol ; ii) 6/12 (50 %) entre os pacientes do grupo de albendazol e , iii) 15/17 (88%) entre os pacientes que receberam o mebendazol. A proporção de pacientes com negatização parasitológica foi significativamente menor entre os pacientes que receberam albendazol quando comparada àquela observada entre os pacientes que receberem mebendazol ou tiabendazol ($p < 0,05$; teste do qui-quadrado). O tiabendazol e o mebendazol demonstraram uma eficácia similar, com taxas de cura semelhantes.

4.4 Caracterização da infecção crônica por *Strongyloides stercoralis* e fatores associados:

Em 11 (34%) dos 32 pacientes foi caracterizada a infecção crônica pela detecção de larvas de *S. stercoralis* em amostras fecais examinadas pela técnica de Baerman-Moraes. Entre os pacientes com infecção persistente, quatro tinham AIDS como doença de base, dois eram portadores de lúpus eritematoso sistêmico (ambos em uso de corticoterapia sistêmica), um tinha infecção pelo HTLV e um pelo HCV. Observou-se que, entre estes onze pacientes, cinco haviam sido tratados com albendazol e dois com subdose de tiabendazol. A média de tempo entre o diagnóstico inicial de estrogiloidíase e o exame realizado para caracterização da infecção persistente foi de 10,2 anos, variando entre 05 e 16 anos. A média de idade destes pacientes foi de 42,4 anos, variando entre 22 e 59 anos. Um dos pacientes foi diagnosticado com estrogiloidíase em 1999, tendo seu exame repetido em 2015, mantendo-se positivo. Este paciente não possuía doença imunológica de base. A Tabela 4.4 compara algumas características dos pacientes que mantiveram infecção persistente e daqueles que tiveram exame negativo na segunda avaliação. Observa-se que a média de idade foi semelhante entre os pacientes positivos e negativos para infecção persistente, 42,3 e 46 anos, respectivamente. Tratamentos mais efetivos para a estrogiloidíase intestinal, como tiabendazol durante 05 dias e ivermectina foram observados apenas no grupo negativo para persistência da infecção. A corticoterapia sistêmica foi observada mais frequentemente entre os pacientes com infecção persistente (02/11; 18,2%) do que entre aqueles com exame negativo no seguimento (01/21; 4,8%) (Tabela 4.5).

As larvas obtidas pela técnica de Baerman-Moraes dos pacientes com infecção persistente foram caracterizadas (Figura 2). O número médio de larvas recuperadas dos pacientes foi 3,7 variando entre duas e 17. Todas as 41 larvas examinadas foram caracterizadas como rabditóides (Figura 2). As dimensões das larvas estudadas são apresentadas na Tabela 4.5.

Tabela 4.4 Características dos pacientes com e sem infecção persistente por *Strongyloides stercoralis*

| | Infecção persistente positiva (n=11) | Infecção persistente negativa (n=21) |
|---------------------------------|---|---|
| Doença de base | | |
| HIV/AIDS | 04 (36,4%) | 03 (14,3%) |
| Lúpus eritematoso sistêmico | 02 (18,2%) | 01 (4,8%) |
| Infecção pelo HTLV | 01 (9,1%) | 0 (0%) |
| Hepatite C | 01 (9,1%) | 01 (4,8%) |
| Artrite reumatoide | 0 (0%) | 01 (4,8%) |
| Tuberculose | 0 (0%) | 01 (4,8%) |
| Paracoccidiodomicose | 0 (0%) | 01 (4,8%) |
| Outras | 03 (27,3%) | 13 (61,9%) |
| Idade (anos) | | |
| 0 – 18 | 0 (0%) | 02 (9,5%) |
| 19 – 40 | 04 (36,4%) | 04 (19%) |
| 41 – 60 | 05 (23,8%) | 05 (23,8%) |
| > 60 | 0 (0%) | 06 (28,6%) |
| Média | 42,3 anos | 46 anos |
| Tratamento prévio | | |
| Albendazol dose única | 04 (36,4%) | 0 (0%) |
| Albendazol 03 dias | 01 (9,1%) | 02 (9,5%) |
| Tiabendazol 03 dias | 02 (18,2%) | 0 (0%) |
| Tiabendazol 05 dias | 0 (0%) | 05 (23,8%) |
| Mebendazol 03 dias | 0 (0%) | 01 (4,8%) |
| Ivermectina | 0 (0%) | 01 (4,8%) |
| Sem dados sobre tratamento | 04 (36,4%) | 12 (57,1%) |
| Corticoterapia sistêmica | | |
| Sim | 02 (18,2%) | 01 (4,8%) |
| Não | 09 (81,8%) | 20 (95,2%) |

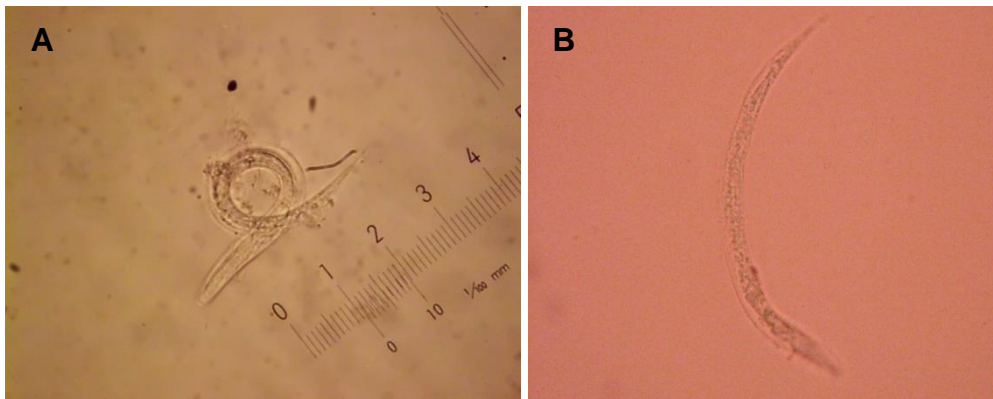


Figura 2. Larvas rabsitóides obtidas em exames de fezes (Baerman-Moraes) de pacientes com infecção persistente (A): amostra paciente HPE 1. (B): amostra paciente HPE 2.

Tabela 4.5 Resultados da análise morfométrica das larvas isoladas das amostras de fezes dos pacientes HPE.

| Amostras | Comprimento (µm) | Largura (µm) |
|-----------------|-------------------------|---------------------|
| HPE1.1 | 13,3 | 0,76 |
| HPE1.2 | 14,06 | 0,95 |
| HPE1.3 | 13,87 | 0,76 |
| HPE 1.4 | 36,19 | 3,04 |
| HPE 1.6 | 41,91 | 2,85 |
| HPE 1.7 | 12,35 | 1,14 |
| HPE 1.12 | 11,4 | 0,76 |
| HPE 1.14 | 1,30 | 1,53 |
| HPE 1.15 | 22,8 | 1,33 |
| HPE 1.16 | 21,8 | 1,52 |
| HPE 1.17 | 20,9 | 1,33 |
| HPE 1.18 | 19,0 | 1,33 |
| HPE 1.19 | 21,8 | 1,52 |
| HPE 1.20 | 18,4 | 1,14 |
| HPE 1.21 | 14,06 | 0,95 |
| HPE 1.22 | 12,9 | 0,76 |
| HPE 1.23 | 12,1 | 0,76 |
| HPE 22.1 | 21,8 | 1,52 |
| HPE 2.2 | 19,0 | 1,33 |
| HPE 2.9 | 15,0 | 0,76 |
| HPE 2.11 | 16,1 | 0,76 |
| HPE 3.1 | 19,0 | 1,52 |
| HPE 3.2 | 16,1 | 0,76 |
| HPE 4.1 | 11,7 | 1,52 |
| HPE 4.2 | 18,05 | 0,95 |
| HPE 5.1 | 19,0 | 1,52 |
| HPE 5.3 | 14,06 | 0,76 |
| HPE 6.1 | 6,2 | 0,95 |
| HPE 6.2 | 19,0 | 1,52 |
| HPE 6.3 | 13,6 | 0,95 |
| HPE 7.1 | 13,6 | 0,76 |
| HPE 7.2 | 12,9 | 0,95 |
| HPE 7.3 | 13,6 | 1,14 |
| HPE 8.1 | 13,3 | 0,76 |

| | | |
|----------|-------|------|
| HPE 8.2 | 14,06 | 0,76 |
| HPE 9.1 | 13,87 | 0,76 |
| HPE 9.2 | 13,3 | 0,95 |
| HPE 10.1 | 14,06 | 0,95 |
| HPE 10.2 | 12,35 | 1,33 |
| HPE 11.1 | 12,1 | 1,33 |
| HPE 11.2 | 20,9 | 1,52 |

4.5 Análise Molecular

Os resultados da extração de DNA das larvas isoladas mostraram uma concentração média do DNA de 16,52 ng/uL e valores mínimos e máximos de 2,6 e 33,5 ng/uL, respectivamente, em 25 larvas (Tabela 4.6). Outras amostras não geraram concentração de DNA suficientes para conduzir a análise molecular com valores de zero ou negativos.

Tabela 4.6. Resultados de concentração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento nucleotídico.

| Amostras | Concentração de DNA (ng/uL) | Resultados da PCR | | Sequências de DNA | |
|-------------------|--------------------------------|-------------------|-----------------|-------------------|----------------|
| | | 18S rDNA | 28SrDNA | 18S rDNA | 28SrDNA |
| HPE 1.1 | 19,5 | + | + | + | + |
| HPE 1.2 | 27,5 | - | - | - | - |
| HPE 1.3 | 18,5 | + | + | + | + |
| HPE 2.1 | 19,5 | - | - | - | - |
| HPE 2.2 | 24,5 | - | - | - | - |
| HPE 2.9 | 18,5 | + | + | + | + |
| HPE 2.11 | 23,5 | - | - | - | - |
| HPE 3.1 | 15,5 | + | - | + | - |
| HPE 3.2 | 28 | * | - | - | - |
| HPE 4.2 | 21 | + | + | + | + |
| HPE 5.3 | 21 | + | + | + | *** |
| HPE 6.1 | 33,5 | + | - | + | - |
| HPE 6.2 | 19 | + | - | + | - |
| HPE 6.3 | 18 | + | - | ** | - |
| HPE 7.1 | 22,5 | + | - | ** | - |
| HPE 7.2 | 18,5 | + | + | ** | + |
| HPE 7.3 | 17,1 | + | + | ** | ** |
| HPE 8.1 | 6 | - | + | - | *** |
| HPE 8.2 | 7,5 | + | + | ** | + |
| HPE 9.1 | 4,4 | + | + | ** | + |
| HPE 9.2 | 10,6 | + | + | *** | + |
| HPE 10.1 | 6,4 | - | - | - | - |
| HPE 10.2 | 4,9 | + | - | + | - |
| HPE 11.1 | 2,6 | - | - | - | - |
| HPE 11.2 | 4,9 | - | - | - | - |
| Total n=25 | 16,52 | 16 (64%) | 11 (44%) | 9 (36%) | 8 (32%) |

*O DNA insuficiente; **Banda de produto de PCR perdida na purificação;

***Cromatograma de baixa qualidade.

Resultados positivos da PCR com os alvos 28S rDNA e 18S rDNA alvo 1 foram obtidos em 16 (64%) e 11 (44%) das amostras, respectivamente, com 17 (68%) amostras positivas em total e 10 (40%) confirmadas para ambos os alvos moleculares (Figura 3, Tabela 4.6). O alvo 2 do 18S rDNA não gerou ampliações de qualidade, e ainda foram identificadas ampliações inespecíficas de fungos e bactérias.

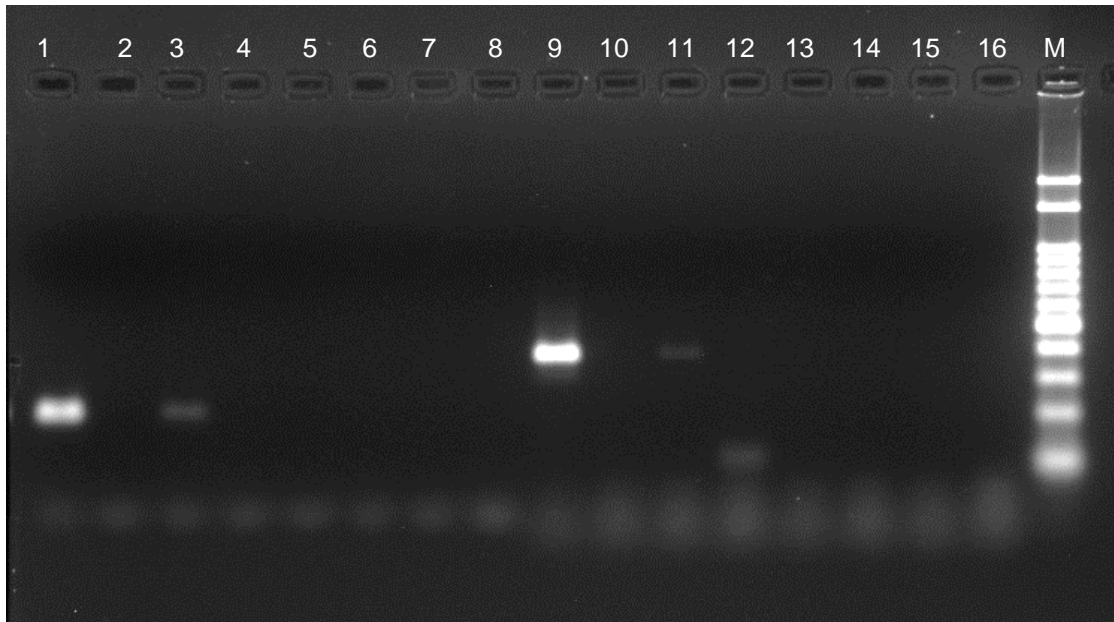


Figura 3. Eletroforese em Gel de agarose a 3%, demonstrando resultados da PCR para detecção de *Strongyloides* sp. Pistas 1-8: alvo molecular 18S rDNA alvo1; 9-16: 28S rDNA. Pistas 1 e 9; HPE1.1; Pistas 2 e 10; HPE1.2; Pistas 3 e 11; HPE1.3; Pistas 4 e 12; HPE2.1; Pistas 5 e 13; HPE2.2; Pistas 6 e 14; HPE2.11; Pistas 7 e 15; Controle negativo da extração de DNA; Pistas 8 e 16; Controle negativo da PCR; M: Marcador de peso molecular 50pb (Invitrogen).

Na maior partes das vezes, foram amplificadas bandas únicas, o que permitiu a purificação direta e posterior sequenciamento direto dos produtos de PCR, o que indica uma especificidade dos alvos da PCR. Entretanto foi baixa a eficiência na purificação dos produtos da PCR e no sequenciamento nucleotídico posterior, principalmente pela baixa intensidade de algumas bandas que foram perdidas nestes procedimentos, ou a baixa qualidade dos cromatogramas resultantes (Figura 3, Tabela 4.6).

Análise das sequências de DNA

Os produtos de PCR foram sequenciados e as sequências foram editadas no programa SegMan v.7 (DNASTar Lasergene) para obtenção da sequência consenso com resultados de sequencias de qualidade em 9 (36%) e 8 (32%) para os alvos 28S rDNA e 18S rDNA, respectivamente (Figura 4).

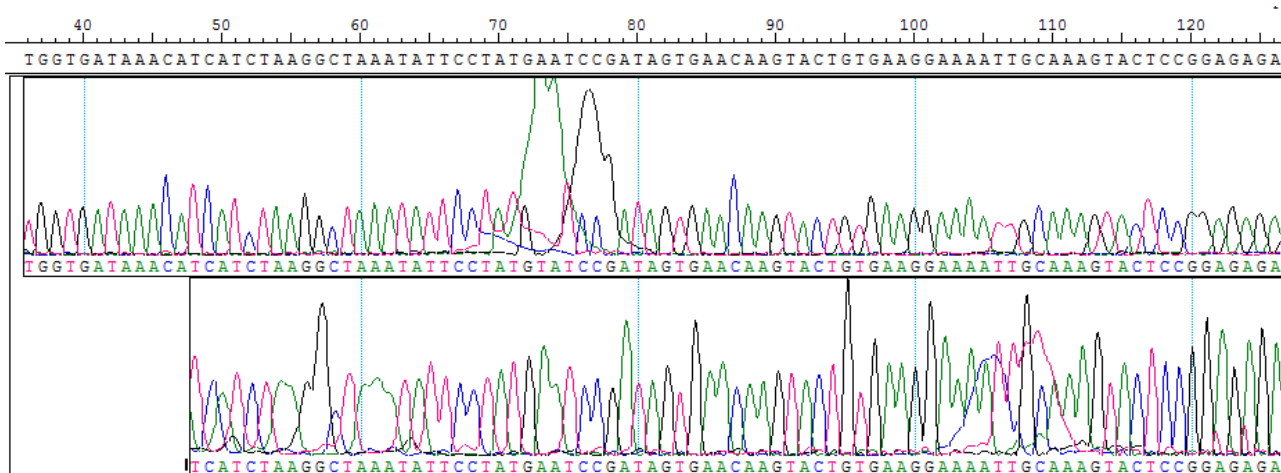


Figura 4. Fragmento de cromatograma na edição de sequências do alvo 28S rDNA de amostra HPE 1.1.

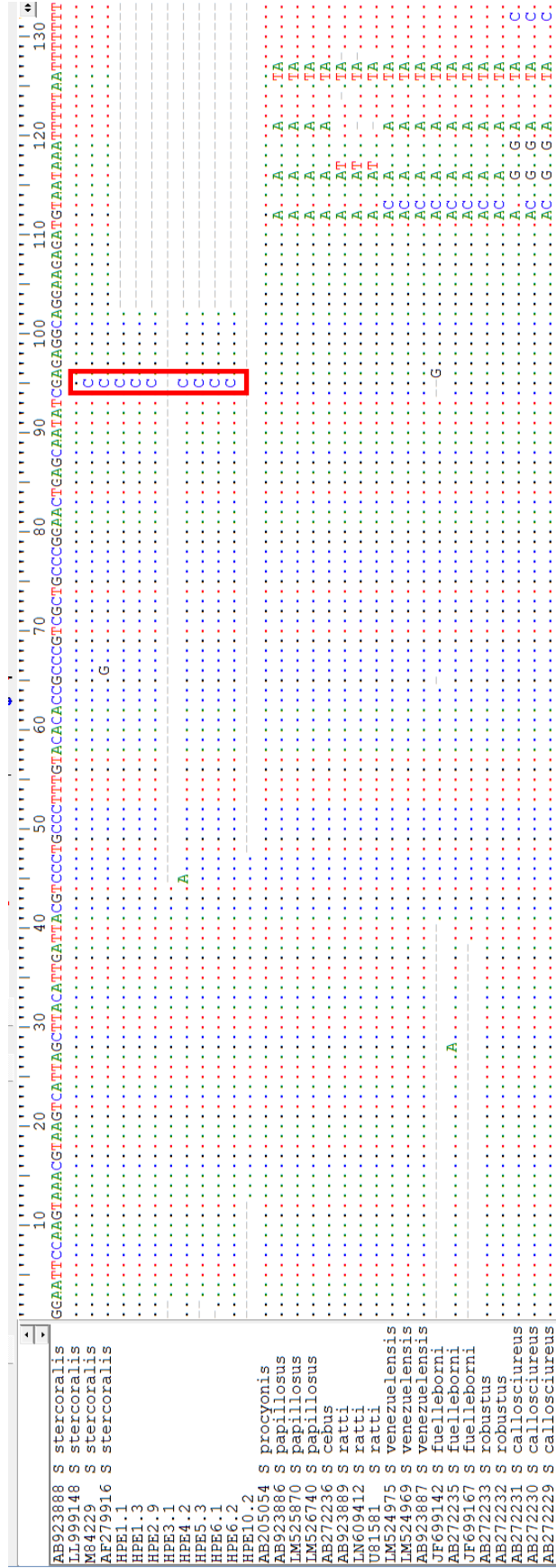
As sequências consensos dos genes alvos foram comparadas com as do Banco Internacional de Sequências *Genbank*, com o uso do comando Blast/NCBI demonstrando para o alvo 18S rDNA, uma identidade de 99-100% em 35-102 pb com as sequências de *S. stercoralis* disponíveis no GenBank. Apesar da alta conservação gênica da região em análise entre todas as sequências do gênero (o que não permitiria uma identificação específica de *S. stercoralis*), foi detectado o polimorfismo G→C na posição 1560 utilizando como sequencia referência de *S. stercoralis* AB923888 [posição 95 (G95C) no alinhamento da Figura 5A] que está presente somente nas amostras de *S. stercoralis*, o que pode ser considerado como

uma assinatura genética. Esta assinatura foi detectada em todas as sequências deste estudo que possuíam cobertura até esta posição, conforme demonstrado na Figura 5A, indicando uma especificidade de espécie.

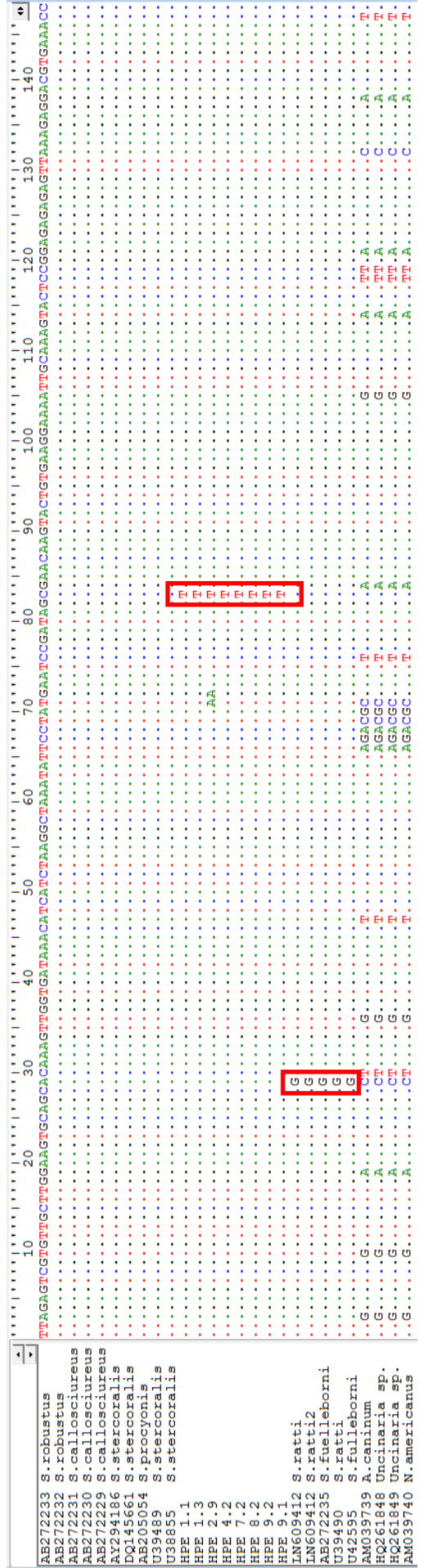
As sequências de 28S rDNA obtidas neste estudo demonstraram uma identidade de 99% de identidade em 180pb com as sequências de *S. stercoralis* disponíveis no *GenBank*. Esta alta identidade com a espécie e o gênero, exclui totalmente a possibilidade de identificação errônea de larvas de ancilostomídeos na análise morfológica inicial, prévia à extração de DNA. Como demonstrado claramente no alinhamento de sequências do gene 28S rDNA, as espécies de ancilostomídeos, *Necator americanus*, *Ancylostoma caninum* e *Uncinaria* sp. apresentam um conjunto de polimorfismos característicos de assinaturas genéticas de ancilostomídeos que estão ausentes no gênero *Strongyloides* (Figura 5B). Novamente, existe uma alta conservação gênica da região em análise entre todas as sequências do gênero *Strongyloides*, que não permitem uma determinação específica da espécie *S. stercoralis*. Entretanto o polimorfismo A211G, segundo a sequência referência *Genbank* de *S. ratti* AY294186 (A29G na Figura 5B) está presente somente nas amostras de *S. ratti* e *S. fuelleborni*. Houve similaridade genética dos isolados dos pacientes com infecção crônica com outras espécies de *Strongyloides*, porém estas não foram descritas como capazes de causar infecção humana. Por último, mas não menos importante, podemos observar um polimorfismo C264T, segundo a sequência referência *Genbank* de *S. stercoralis* AY294186 (C83T na Figura 5B) presente somente nas amostras deste estudo, o que sugere uma nova assinatura genética.

As análises filogenéticas demonstradas na Figura 6 foram construídas com base somente no alvo 28S rDNA por apresentar um tamanho maior e relativa variabilidade ao contrário do alvo 18S rDNA. Foram geradas árvores filogenéticas dois métodos (NJ e ML) e incluindo ou não os membros de outros gêneros. Para a análise NJ K2P foi aplicado o modelo K2P seguindo o protocolo Barcoding CBOL. Para ML os modelos selecionados pela

A



B



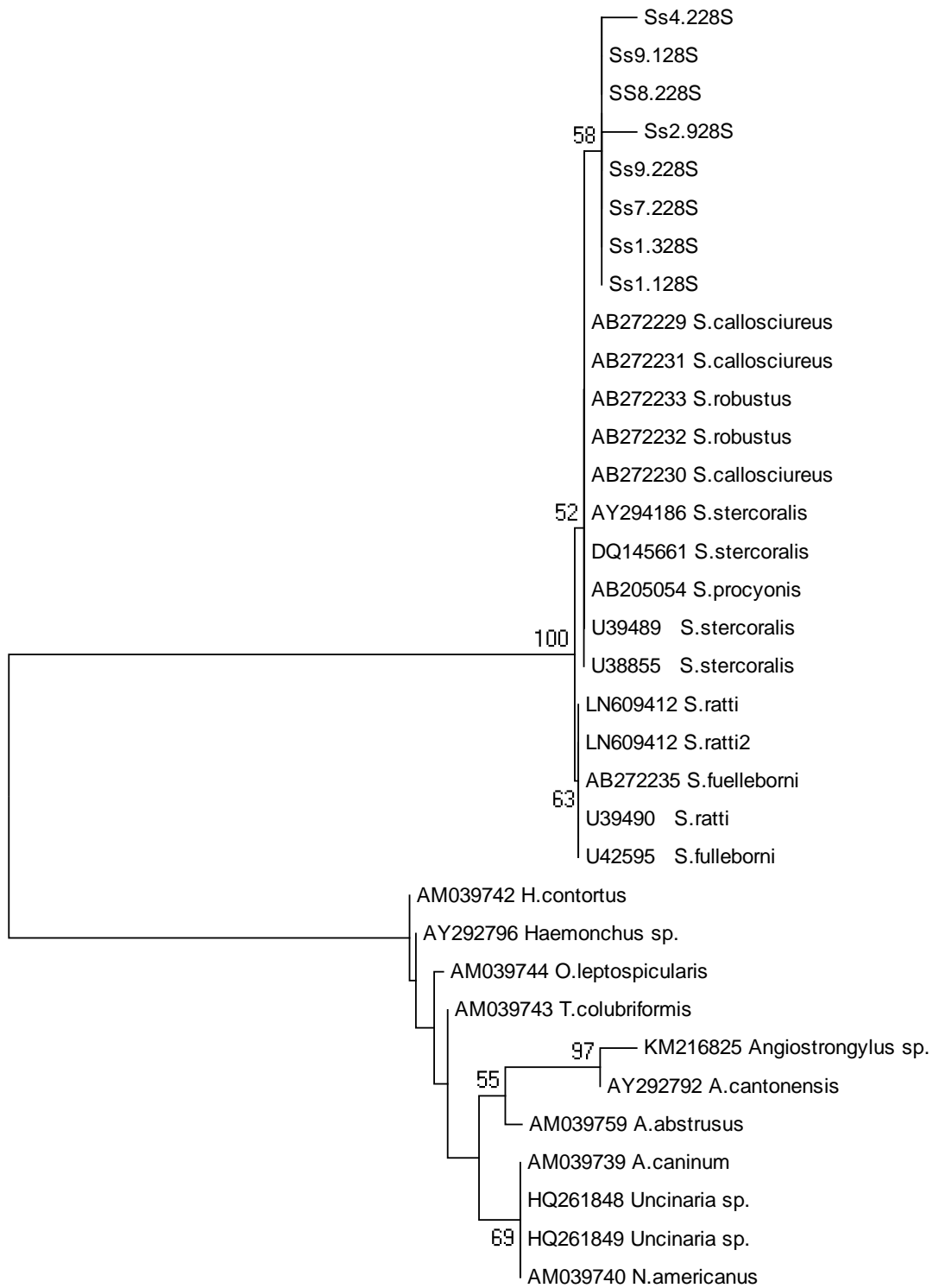
Alinhamentos nucleotídico das sequências de *Strongyloides* sp. obtidas neste estudo com as sequências referenciadas disponíveis no GenBank. A: alvo molecular do gene 18S rDNA; B: alvo molecular do gene 28S rDNA. As amostras do estudo estão identificadas como HPE. Sequências referenciadas estão mostradas com o nome da espécie e o número de acesso do *GenBank*. As assinaturas genéticas estão em caixa vermelha.

Análises foram K2P+I e K2P, para o *dataset* com e sem os outros gêneros além de *Strongyloides* sp., respectivamente.

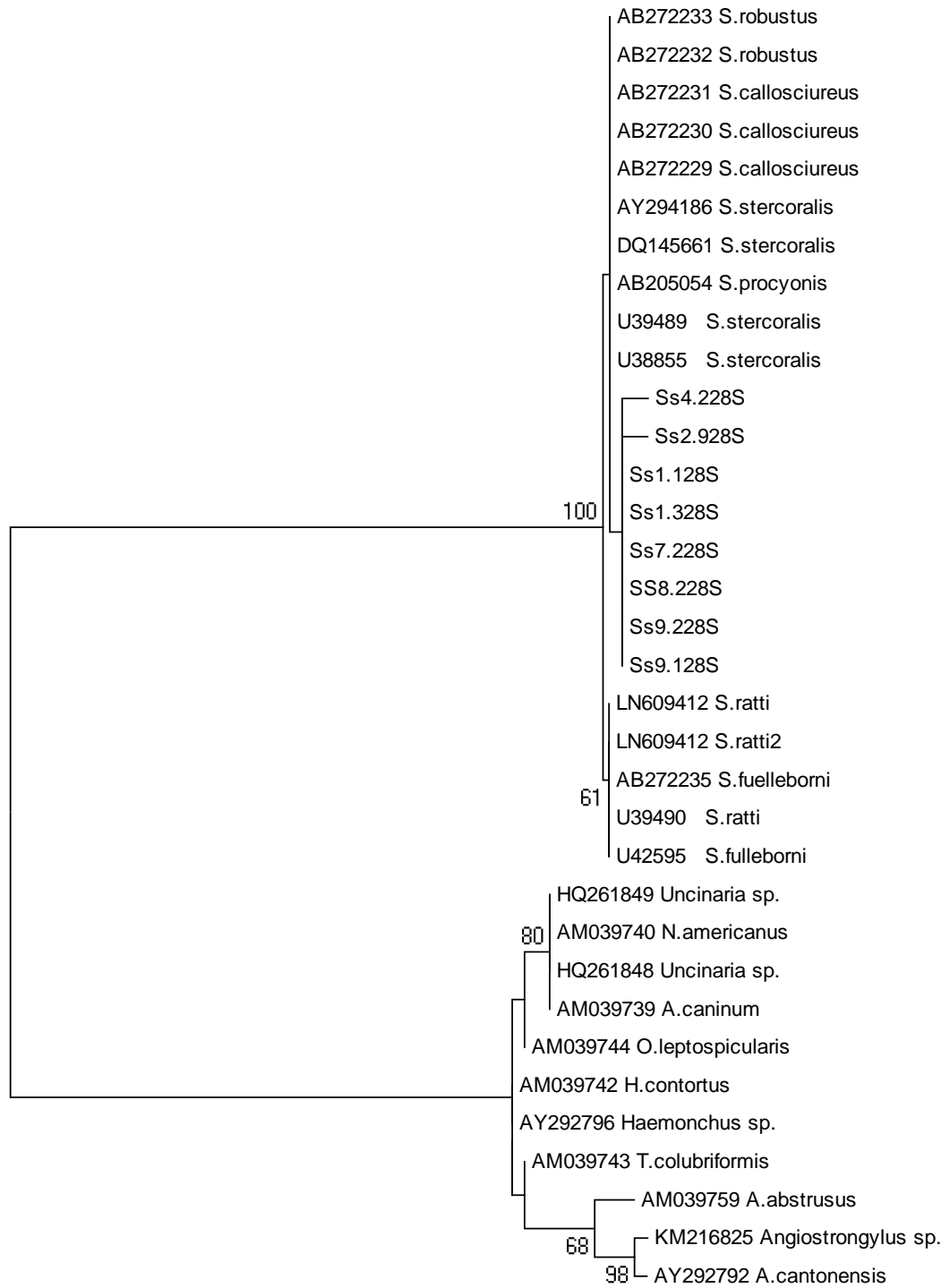
Apesar de o gene 28S rDNA ser conservado e não ser considerado para discriminar espécies, a análise filogenética com ambos os métodos o sem ou com os grupos externos demonstra claramente que os parasitos pertenciam ao gênero *Strongyloides* e permitiu descartar a possibilidade de tratar-se de ancilostomídeos, confirmando a análise genética de ambos os genes (Figura 6). Um grupo com um alto valor estatístico de *bootstrap* é formado somente com membros do gênero *Strongyloides* incluindo as sequências geradas neste estudo. Puderam também ser descartadas infecções por duas espécies de *S. ratti* e *S. fuelleborni* que foram um discreto subgrupo dentro do gênero. Importaneamente, *Strongyloides fuelleborni* é a outra espécie do gênero capaz de infectar o homem.

O conjunto da análise genética, filogenética e das relações parasito-hospedeiro, nos permite concluir que os isolados pertencem à espécie *S. stercoralis*.

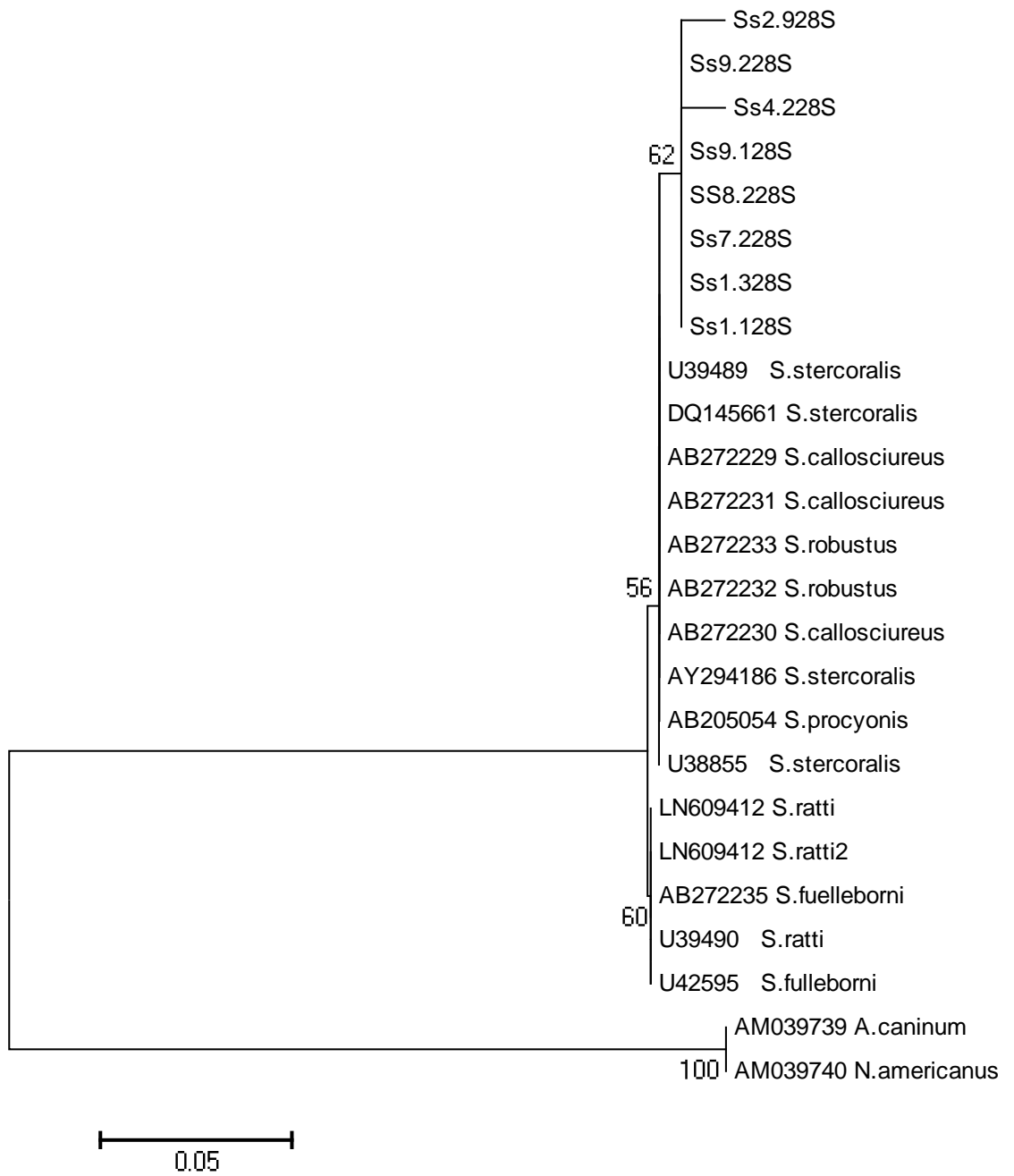
Adicionalmente, um subgrupo muito bem definido, e por vezes com um suporte estatístico médio, formado somente com as sequências de *S. stercoralis* deste estudo é visível. Isto reforça a ideia de que os isolados do Brasil teriam um componente de especificidade que diferencia dos outros *S. stercoralis* disponíveis no banco, com procedência identificável na Ásia, entre outros.



0.05



0.05



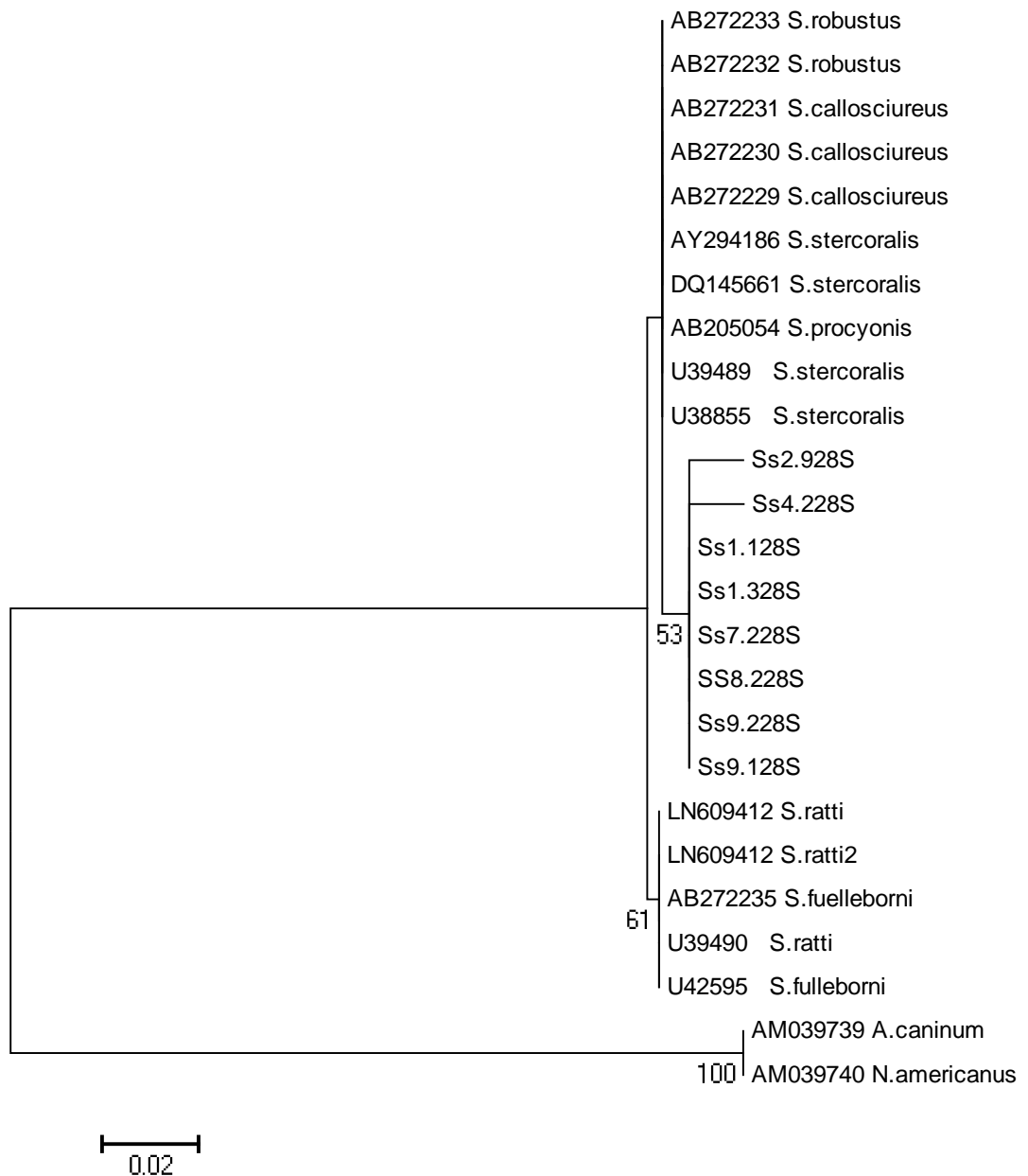


Figura 6: Árvore filogenética das sequências de *Strongyloides* do gene ribossomal 28S RNA obtidas no estudo. A. Árvore de NJ com modelo K2P B. Árvore ML com modelo K2P+I como gerado na análise. C. NJK2P. D. MLK2P. Amostras deste estudo HPE=SS. Sequencias referencias estão mostradas com o nome da espécie e o número de acesso do *GenBank*.

5. Discussão:

Este estudo descreve uma casuística de 267 pacientes com estrogiloidíase intestinal não complicada, os quais eram portadores de diversas doenças de base, tendo sido avaliados com o exame parasitológico de fezes pela técnica de Baerman-Moraes. Uma grande proporção dos pacientes realizou a investigação para estrogiloidíase no contexto da necessidade de se submeter à terapia imunossupressora, seja com corticoides ou quimioterapia antineoplásica. A casuística inclui ainda pacientes com HIV/AIDS, infecção pelo HTLV, hepatites virais e tuberculose.

Entre os casos, grande parte possuía como escolaridade apenas o ensino fundamental incompleto. Visto que o estudo foi realizado no Rio de Janeiro, predominaram naturais deste estado. A descrição das características epidemiológicas dos pacientes revela uma grande amplitude de idades, predominando, entretanto adultos jovens do sexo masculino, economicamente ativos. A presença da estrogiloidíase, em prevalência elevada em pessoas que trabalham na agricultura foi demonstrada na China, em estudo que também relata a associação desta parasitose com o trabalhador do sexo masculino (Steinmann et al. 2007).

De acordo com Davidson et al. (1984), os homens possuem maior risco de adquirir a estrogiloidíase do que as mulheres. Estudos em ratos realizados por Kiyota et al. (1984), levantaram a hipótese de que fatores hormonais possam estar envolvidos. Devido a tratar-se de uma infecção transmitida pela via percutânea, a exposição ao solo é um fator de risco para aquisição desta parasitose. A maior exposição de homens em atividades ligadas à agricultura ou mesmo recreacionais poderia explicar e maior frequência do sexo masculino nesta casuística de estrogiloidíase intestinal. Walzer et al., 1982 analisaram casos de estrogiloidíase em Kentucky, nos Estados Unidos, relatando que os pacientes eram predominantemente do sexo masculino, adultos, praticantes de atividades que propiciam o contato com o solo, com menor nível socioeconômico e, frequentemente, com doenças de base.

No presente estudo, notou-se que uma proporção significativa das pessoas com estrogiloidíase relatou já ter praticado atividades relacionadas à agricultura. Este histórico de atividade ligada à agricultura pode ser explicado pela exposição ao solo contaminado sem a utilização de equipamentos de proteção. Os espaços interdigitais dos dedos dos pés como portas de entrada para as larvas de *S. stercoralis* é um aspecto descrito por Leyva et al. (2011). Prevalência elevada de estrogiloidíase em áreas rurais do Camboja foi relatada por Khieu et al.(2014), em estudo que também demonstra a associação entre esta infecção e o sexo masculino, com taxas de infecção que são maiores nas faixas etárias mais elevadas.

Os dados deste estudo confirmam que a estrogiloidíase no Brasil está presente predominantemente em homens, sendo a infecção possivelmente adquirida em décadas passadas persistindo assintomática e sendo detectada quando estas pessoas, por apresentarem condições clínicas complexas requerendo hospitalização e terapia imunossupressora, realizam exames de rotina, incluindo a avaliação coproparasitológica pela técnica de Baerman-Moraes. Quando questionamos a profissão dos casos, nos chamou atenção a parcela significativa de aposentados. Assim, pode-se demonstrar a longevidade da infecção por este helminto, que nos exames parasitológicos de fezes em sua maioria, foi identificado sem associação com algum outro parasito. Deve-se considerar que os exames parasitológicos de fezes realizados rotineiramente em nível de atenção primária à saúde ou mesmo em laboratórios particulares não realiza a técnica de Baerman-Moraes, não tendo capacidade, portanto, de diagnosticar a infecção por *S. stercoralis*. Desta forma, a estrogiloidíase passa a ser diagnosticada apenas no nível terciário, em hospitais com maior infraestrutura laboratorial.

No Brasil, inquéritos em população idosas em Uberlândia, Minas Gerais, encontrando taxa de positividade para larvas de *S. stercoralis* de 5%, com maior frequência no sexo masculino. Entretanto, poucos estudos de prevalência de parasitoses intestinais realizados no país utilizam metodologia adequada para diagnóstico da estrogiloidíase. Estudo realizado no âmbito da disciplina Epidemiologia Aplicado do Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical, do Instituto Oswaldo Cruz, incorporou esta técnica para o diagnóstico das parasitoses intestinais no Alto Rio Negro, identificando taxas de prevalência entre 3 a 5% em Santa Isabel do Rio Negro (Carvalho-Costa et al. 2007, Valverde et al. 2011). Na região nordeste, temos também utilizado estas técnicas, identificando taxas de

prevalência em torno de 1%, em regiões rurais dos estados do Piauí e Ceará (Valverde et al. 2011)

O presente trabalho inclui um estudo de caso-controle, no qual foi possível parear, por idade, casos de estrogiloidíase intestinal e pacientes negativos para esta parasitose. Os controles eram todos acompanhados no HUPE por diversas condições clínicas e em diferentes serviços e especialidades médicas.

Para o estudo de caso-controle, as diferentes doenças de base foram agrupadas. O achado principal deste estudo foi que as doenças reumatológicas estavam presentes em proporção significativamente maior entre os pacientes positivos para *S. stercoralis* do que entre os controles, em uma razão de aproximadamente 4:1. Entre os pacientes com doenças reumatológicas havia casos de lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide e outras condições. Um aspecto importante é que os pacientes positivos apresentavam estrogiloidíase intestinal não complicada, não sendo observados casos de estrogiloidíase grave ou disseminada. Desta forma, deve-se interpretar com cautela a provável associação entre a estrogiloidíase presente no grupo de pacientes com doenças auto-imunes, e o uso de terapia imunossupressora e corticoides. Argumentamos que, mesmo não tendo sido identificados casos de estrogiloidíase disseminada entre os pacientes com doenças reumatológicas, é possível que a terapia imunossupressora e a corticoterapia estejam associadas a maior multiplicação do parasita no intestino e maior capacidade de detecção pelo exame parasitológico. Genta (1992) discute aspectos relacionados à hiperinfecção e formas disseminadas na estrogiloidíase. Em sua argumentação, traz a hipótese de que os corticosteroides podem agir nos parasitas, de forma análoga aos ecdisteróides, hormônios dos helmintos capazes de induzir a muda das larvas, aumentando a produção de larvas filarióides no tubo digestivo do hospedeiro e consequentemente levando a taxas mais elevadas de autoinfecção. Com esta perspectiva, os efeitos da dexametasona sobre o desenvolvimento de *S. venezuelensis* em um modelo murino foi estudado, revelando maior fertilidade das fêmeas do parasita quando este fármaco foi administrado em ratos (Machado et al., 2011).

A literatura traz diversos trabalhos, a maioria relatos de caso, demonstrando a síndrome de hiperinfecção por *S. stercoralis* em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.

Com relação à presença da estrogiloidíase em pacientes com doenças reumatológicas, o presente estudo aponta para a possibilidade de que a terapia imunossupressora ou a desregulação imune presente nas doenças reumáticas podem estar associadas não só à disseminação da estrogiloidíase, mas também à forma intestinal não complicada da doença.

A associação entre a infecção pelo HTLV e a estrogiloidíase tem sido estudada por alguns autores. No Brasil, Furtado et al. (2013) chamam a atenção para a presença de infecção por *S. stercoralis* em 10% dos pacientes com HTLV 1/2 atendidos em um centro de referência no estado do Pará. Sugere-se que a interação entre o HTLV e *S. stercoralis* seja decorrente de desregulação imunológica do hospedeiro, com proposto por Satoh et al. (2002), que demonstraram menores taxas de cura desta helmintíase em pacientes com HTLV, em um mecanismo dependente de TNF e TGF-beta. Menores taxas de cura e maior prevalência da estrogiloidíase em portadores do HTLV foram também relatadas por Hirata et al. (2006) que sugerem haver sinergismo entre os patógenos nesta coinfeção, levando a maior carga parasitária e maior carga viral do HTLV. O presente estudo comparou a prevalência de infecção pelo HTLV nos grupos positivo e negativo para *S. stercoralis*, revelando taxas de positividade bastante semelhantes, de 8,4% e 9%, respectivamente, não identificando, portanto, o HTLV como uma infecção associada à estrogiloidíase.

Com relação à interação entre a estrogiloidíase e a AIDS, o presente estudo indica que a frequência de infecção pelo HIV tende a ser maior entre os pacientes positivos para *S. stercoralis*, quando comparados aos pacientes sem esta helmintíase, porém sem significância estatística. Um estudo de caso-controle realizado na Tailândia sugere que o HIV é um preditor da estrogiloidíase (Paporiboune et al. 2014). No Brasil, Bachur et al. (2008) comparou as taxas de positividade para *S. stercoralis* em pacientes com AIDS nos períodos anterior e posterior à implementação da terapia antirretroviral combinada, relatando frequências de 30% e 11%, respectivamente, sendo a estrogiloidíase mais frequente em pacientes do sexo masculino. No presente estudo, observamos que a coinfeção com HIV esteve presente nos casos e controles com frequências semelhantes. Com o início da epidemia de AIDS, nos anos 1980, conhecendo-se o fato da estrogiloidíase ser uma parasitose cuja morbidade é influenciada pela imunidade do hospedeiro, acreditou-se que *S. stercoralis* seria incluído no grupo de patógenos oportunistas. O assunto foi revisto recentemente por Siegel & Simon

(2012). Argumenta-se que o efeito imunossupressor predominante de infecção por HIV é uma deficiência imunitária celular, conforme evidenciado por um declínio progressivo em linfócitos CD4 +. No entanto, dentro da população de células CD4 +, existe um maior declínio na atividade das células T auxiliares Tipo 1 (Th1) do que do tipo T helper 2 (Th2). Células Th1 produzem uma variedade de citocinas pró-inflamatórias que modulam a resposta imune celular, incluindo interferon gama (IFN- γ), interleucina 2 (IL-2) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) [10]. As células Th2, por outro lado, são mais ativos na mediação da imunidade humoral e produzem citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. O conceito de Th1 para Th2 no decurso da infecção por HIV tem sido avançado por alguns investigadores como um marcador para a progressão do HIV. Outros não confirmaram estes resultados e eles permanecem um tanto controverso. No entanto, ao passo que há uma profunda perda de atividade imunitária Th1 em pacientes com AIDS avançada, pode haver pouca alteração na atividade das citocinas mediadas por Th2. De fato, os níveis de citocinas Th2, IL-4 e IL-10, foram encontrados por serem mais elevadas em pacientes infectados com HIV, tanto com ou sem infecções oportunistas, do que nos controles não infectados. A potencial consequência disto é que para muitos pacientes co-infectados, a resposta Th2 mediada a infecções por helmintos pode ser conservada.

Neste sentido, argumentamos que a associação entre a estrogiloidíase e a AIDS decorre de fatores comportamentais que possibilitam uma maior exposição à infecção pelo parasito em pacientes coinfectados.

O sinergismo entre os patógenos *S. stercoralis* e *Mycobacterium tuberculosis* tem sido investigado. Foi demonstrado que a coinfeção com *S. stercoralis* é associada a um decréscimo significativo nos níveis séricos de proteínas de fase aguda, metaloproteases, assim como de marcadores de ativação sCD14 e sCD163, de modo que o parasita é capaz de modular a resposta do hospedeiro à tuberculose, atenuando a sua gravidade (George et al., 2014).

Por outro lado, estudos em modelos animais sugerem que a intensificação das respostas celulares Th1 que ocorrem no curso da tuberculose, ocasionando maior produção de IFN-gama e IL-10 e declínio na produção de IL-4 e IL-13 favorecem a infecção por *S. stercoralis*, aumentando sua carga parasitária (Carmo et al., 2009). Embora não seja rotina a investigação da presença da estrogiloidíase em pacientes diagnosticados com tuberculose, observamos no presente estudo que, entre os pacientes com estrogiloidíase estudados, uma importante proporção tinha

tuberculose, sendo a presença desta doença duas vezes mais frequente entre os casos do que entre os controles.

Graeff-Teixeira et al. (2008), na cidade de Porto Alegre, RS, realizaram um estudo com pacientes portadores de neoplasias, demonstrando que 8,3% destes pacientes apresentavam larvas de *S. stercoralis* em suas fezes, detectadas através do método de Baerman-Moraes, sendo que nenhum deles apresentou estrogiloidíase complicada, como também demonstramos na nossa série de casos. No presente estudo, observamos que as neoplasias são doenças presentes em portadores desse helminto. O diagnóstico de câncer, como condição clínica de base, foi mais frequentes entre os casos de estrogiloidíase do que entre os controles. Estes pacientes, mesmo em uso de corticoterapia não evoluíram para disseminação da parasitose. Zueter et al. (2014) investigaram a presença da estrogiloidíase em 192 pacientes com neoplasias, identificando apenas um (0,5%) paciente positivo.

Embora tenha sido detectada nenhuma associação entre infecção por *S. stercoralis* e hepatite viral, relatórios indicaram que a terapia antiviral com ribavirina poderia desencadear estrogiloidíase disseminada em pacientes parasitados. Nosso estudo descobriu que a frequência de infecção pelo vírus da hepatite vírus B e C foi um pouco maior entre os pacientes com estrogiloidíase do que no grupo controle. Paraná et al. (2000) descrevem dois casos de estrogiloidíase disseminada no Brasil, após início de tratamento de hepatite C com ribavirina e interferon.

A importância do diagnóstico de estrogiloidíase em pacientes com doença renal crônica é a possibilidade da terapia imunossupressora após o transplante renal. Assim, os pacientes transplantados devem também ser avaliados para infecção por *S. stercoralis*. Casos de estrogiloidíase disseminada após transplante renal têm sido relatados. A hiperinfecção por *S. stercoralis* após corticoterapia devido à síndrome nefrótica também foi notificada. Copelovitch et al. (2010) relatam a detecção três vezes mais frequente de *S. stercoralis* em crianças com síndrome nefrótica comparadas com crianças sem esta afecção renal. A importância da infecção por *S. stercoralis* em pacientes com neoplasias reside no fato de que a quimioterapia imunossupressora pode conduzir a formas graves desta parasitose. Estrogiloidíase em pacientes sujeitos a quimioterapia deve ser adequadamente tratado com fármacos eficazes. Neste estudo, quase 10% dos infectados com estrogiloidíase estavam associados a neoplasias malignas; esta taxa atingiu 5,2% entre os controles. Esses dados reforçam a necessidade de realização de exame de fezes adequado para a detecção de larvas de *S. stercoralis* no tratamento de rotina

de pacientes com diagnóstico de câncer. A importância do diagnóstico de estrogiloidíase em pacientes com doença renal crônica é a possibilidade da terapia imunossupressora após o transplante renal. Assim, os pacientes transplantados devem também ser avaliados para infecção por *S. stercoralis*. Embora os pacientes com doenças respiratórias crônicas costumem usar esteróides, não observamos associação deste grupo de doenças com estrogiloidíase. Importante ressaltar que a estrogiloidíase por si só, pode ser uma causa de sintomas pulmonares obstrutivas.

Observamos que as neoplasias são doenças presentes em portadores desse helminto. Estes pacientes, mesmo em uso de corticoterapia não evoluíram para disseminação da parasitose. Outras doenças presentes em pacientes com estrogiloidíase, que mesmo em uso de corticoterapia sem tratamento prévio da parasitose também não apresentaram disseminação para outros órgãos e tecidos.

É interessante notar, neste estudo, que a frequência de doenças cardiológicas foi significativamente maior entre os controles não infectados do que entre os pacientes com estrogiloidíase. Deve-se considerar que pacientes com condições cardiológicas como doença de base usualmente não estarão submetidos a terapias imunossupressoras, como os aqueles incluídos nos demais grupos de patologias definidos neste estudo.

Para autores como González et al. (2010), a eosinofilia é um achado inconstante na estrogiloidíase e pode flutuar em diferentes graus. Em pacientes imunodeprimidos por alguma doença ou em uso de imunossupressores pode estar até ausente. Identificamos que as contagens relativas médias de eosinófilos foram significativamente superiores no grupo de pacientes com estrogiloidíase do que no grupo de controles negativos para esta parasitose. Desta forma, foi também observada uma média inferior de contagem relativa de neutrófilos no grupo positivo para *S. stercoralis*. A associação entre a estrogiloidíase e a eosinofilia é bem estabelecida, embora a ausência desta correlação tenha também sido apresentada na literatura (Salim et al., 2014). Modelos animais têm demonstrado que os eosinófilos são capazes de conter a infecção por *S. stercoralis*, matando as larvas ativamente, no contexto da resposta imune primária (O'Connell et al., 2011).

Em nosso estudo a ivermectina foi a droga de melhor eficácia, e o tiabendazol em comparação com o mebendazol demonstraram uma taxa de cura semelhante. A negativação parasitológica foi significativamente menor entre os pacientes que receberam albendazol.

O albendazol tem se mostrado menos eficaz na erradicação do helminto. Diversos estudos clínicos demonstram que o albendazol não possui uma taxa de cura relevante quando comparado a outros anti-helmínticos disponíveis atualmente (Rialch et al., 2013). O tiabendazol é considerado fármaco de primeira linha pela capacidade em erradicar o helminto, mas possui efeitos adversos graves, principalmente hepáticos, que podem descontinuar o tratamento em alguns casos (Bisoffi et al., 2011). Alguns autores compararam a ivermectina e o tiabendazol relatando para ambos uma boa resposta terapêutica, destacando apenas a ivermectina por melhor tolerância clínica (Massoud, et al., 2006; De Souza et al., 2014). Destaque esse que também pode ser dado ao mebendazol, identificado em nosso estudo como uma boa alternativa na impossibilidade de resistência ao tiabendazol, e com menos efeitos colaterais. Portanto, o mebendazol mesmo sendo classificado por alguns autores com baixa eficácia, por provavelmente só suprimir a infecção por um curto período de tempo, pode em associação com o tiabendazol, ser um tratamento seguro, com alta taxa de cura e baixa toxicidade.

A infecção crônica assintomática pelo *S. stercoralis* foi encontrada nos pacientes com AIDS e lúpus eritematoso sistêmico, esse último mesmo em uso de corticoterapia sistêmica não evoluiu com disseminação e/ou complicações infecciosas associadas a essa helmintíase (Schär et al, 2013) A persistência dessa infecção assintomática foi de 10,2 anos, chegando a 16 anos em um caso sem doença imunológica, por isso a necessidade de triagem de pacientes mesmo assintomáticos (Costa-Cruz, 2003). Keiser et al., 2004 relataram em seus estudos que mais de 50% dos pacientes com estrogiloidíase são assintomáticos, o que reforça a detecção desses casos principalmente se forem imunossuprimidos.

A média de idade destes pacientes foi a mesma nos dois grupos, com e sem infecção diagnosticada, estudos como o de Baptista et al., 2006 que apontam o adulto jovem como economicamente ativo e com maior contato com solo, principalmente os oriundos em localidades rurais.

Tratamentos menos efetivos para a estrogiloidíase intestinal, como o albendazol e a dose única de tiabendazol foram observados nesses casos, o que pode também estar associado à persistência da infecção. O esquema terapêutico para estrogiloidíase com ivermectina se tornou mais recomendado, por está associada a maior erradicação de larvas do parasito comparado ao albendazol, com menos efeitos colaterais que o tiabendazol prescrito em dose efetiva para o tratamento (Luna et al., 2007)

A presença exclusiva de larvas rabditóides nas amostras não condiz com a teoria da auto-infecção externa como na perpetuação do ciclo evolutivo e induzindo a hiperinfecção do parasito.

Diversos estudos são realizados para determinar as sequências genéticas desse helminto. Vários marcadores moleculares podem ser utilizados para fornecimento de informações sobre a variabilidade genética do *S. stercoralis* por meio de detecção de polimorfismos de DNA.

A caracterização molecular das larvas obtidas dos pacientes submetidos à reavaliação parasitológica após intervalo de tempo variável desde o diagnóstico inicial possibilitou confirmar a infecção pelo gênero *Strongyloides*. A importância desta confirmação reside no fato de que larvas de outros geohelminthos podem ser encontradas em exames parasitológicos de fezes, particularmente larvas de *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*. Os ancilostomídeos pertencem à mesma ordem Strongilida, à qual pertence *Strongyloides stercoralis*, os ovos destas três espécies são indistinguíveis à microscopia óptica. Embora não seja comum a eliminação de larvas na ancilostomíase, é frequente que os ovos de ancilostomídeos eclodam em amostras fecais após 48 horas, antes que estas sejam examinadas. Desta forma, estas larvas podem ser detectadas pela técnica de Baerman-Moraes, e erroneamente diagnosticadas como larvas de *S. stercoralis*. Há diferenças morfológicas entre as larvas de ancilostomídeos e *S. stercoralis*, como o entalhamento caudal, característico desta última espécie. Entretanto, a visualização desta característica morfológica requer experiência e, em alguns casos, imobilização da larva, elementos ausentes em grande parte dos laboratórios de parasitologia.

A análise das sequências nucleotídicas das larvas possibilitou também descartar a infecção por *S. fuelleborni*, outra espécie capaz de infectar o homem.

As análises deste estudo contribuem com as tendências atuais de desenvolvimento de ferramentas moleculares para o diagnóstico da estrogiloidíase humana. Nesta perspectiva, Sharifdini et al. (2015), considerando os métodos parasitológicos como padrão ouro, observaram que a sensibilidade e a especificidade da *nested* PCR para diagnóstico da estrogiloidíase, utilizando o gene da enzima citocromo c oxidase com alvo molecular, atingiram 100% e 91,6%, respectivamente. Com relação à PCR em tempo real utilizando o gene ribossomal 18S, o mesmo utilizado no presente estudo, a sensibilidade e a especificidade foram de 84,7% e 95,8%, respectivamente. A PCR em tempo real foi também empregada para o diagnóstico da estrogiloidíase em humanos na

Espanha (Saugar et al., 2015). O PCR convencional utilizando como alvo o gene 18S foi empregado para diagnóstico no Brasil por Sitta et al. (2014).

As abordagens moleculares com o gene 18S permitem também a avaliação de variabilidade genética intraespecífica em *S. stercoralis*. Neste sentido, foi observada divergência genética de larvas obtidas na Tailândia e no Japão (Pakdee et al., 2014). No presente estudo, descreveu-se, pela primeira vez, assinatura genética específica nos isolados brasileiros, depositando-se as primeiras sequências brasileiras de *S. stercoralis* no Gene Bank.

Concluimos nesse estudo que a estrogiloidíase deve ser rotineiramente investigada em pacientes assintomáticos ou não com condições complexas exigindo terapia imunossupressora ou não. O diagnóstico deve ser feito por métodos parasitológicos adequados, tais como a técnica Baerman-Moraes. Por muitas vezes, por ser de difícil diagnóstico, testes moleculares e tratamento empírico acabam por serem justificados em grupos específicos.

6. PERSPECTIVAS

A literatura brasileira sobre a estrogiloidíase é escassa. Temos a perspectiva de aumentar o número de amostras positivas, recrutando familiares dos casos de estrogiloidíase apresentados neste estudo. O objetivo é ampliar as análises filogenéticas, inclusive em outras regiões do país.

Uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na infecção crônica se faz necessária, sendo as análises moleculares importantes também neste sentido.

O presente estudo não incluiu casos de hiperinfecção ou estrogiloidíase disseminada. É possível que casos não estejam sendo diagnosticados no HUPE, em serviços como Hematologia, Oncologia e Reumatologia. Uma rotina diagnóstica para identificação da estrogiloidíase disseminada e da hiperinfecção deveria ser implementada de forma mais efetiva, e a demonstração da infecção crônica em pacientes com neoplasias e colagenoses contribui com a perspectiva de melhoria da capacidade diagnóstica dos casos graves.

7. CONCLUSÕES

- A estrogiloidíase estava presente predominantemente no adulto jovem, do sexo masculino, ligado à atividade agrícola.
- Na maioria dos indivíduos infectados por *S. stercoralis*, a doença crônica do trato gastrointestinal era assintomática, sendo detectada por exames laboratoriais de rotina.
- As doenças reumatológicas estão significativamente associadas à estrogiloidíase intestinal.
- Pacientes que apresentavam doenças relacionadas com a estrogiloidíase, como HIV/AIDS, tuberculose, paracoccidiodomicose, e infecção pelo HTLV, mesmo em uso de corticoterapia sem tratamento prévio da parasitose, não evoluíram com formas graves da helmintíase.
- Nos exames parasitológicos de fezes dos pacientes foram observadas apenas larvas rabditóides, o que sugere que a autoinfecção externa não é o principal mecanismo de perpetuação da infecção no grupo de pacientes estudado.
- As taxas de cura em pacientes que receberam tiabendazol e mebendazol foram superiores ao albendazol. A ivermectina e o tiabendazol por cinco dias foram as drogas utilizadas nos casos sem infecção persistente.
- As análises moleculares confirmaram o gênero *Strongyloides*, descartando também a infecção por *S. fuelleborni* e identificando assinaturas genéticas próprias de amostras brasileiras.

8. Referências Bibliográficas

Andrade EC, Leite ICG, Rodrigues VO et al. Parasitoses intestinais: uma revisão sobre os aspectos sociais, epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. APS 2010; 13 (2): 231 – 240.

Arch EL, Schaefer JT, Dahiya A. Cutaneous manifestation of disseminated strongyloidiasis in a patient coinfectd with HTLV-I. Dermatol Online J 2008;15; 14(12):6.

Bachur TP, Vale JM, Coelho IC et al. Enteric parasitic infections in HIV/AIDS patients before and after the highly active antiretroviral therapy. Braz J Infect Dis 2008; 12(2):115-122.

Basuni M, Muhi J, Nurulhasanah O et al. Pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. Am J Trop Med Hyg 2011; 84(2): 338–343.

Baermann G. Eine Einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden). Erdproben Meded Geneesk 1917; 41.

Beach TV. Experimental studies on human and primate species of *Strongyloides*: V. – the free-living phase of the life cycle. Am J Hyg 1936; 23: 243-277.

Benincasa CC, Azevedo FO, Canabarro, MS. Hiper-Infecção por *Strongyloides stercoralis*. Relato de Caso. Revista Brasileira de Terapia Intensiva 2007; 19: 128-131.

Bachur TP, Vale JM, Coelho IC et al. Enteric parasitic infections in HIV/AIDS patients before and after the highly active antiretroviral therapy. Braz J Infect Dis 2008; 12 (2):115-122.

Baptista SC, Breguez JMM, Baptista MCP et al. Análise da incidência de parasitoses intestinais no município de Paraíba do Sul, RJ. RBAC 2006; 38(4): 271-3.

Bisoffi Z, Buonfrate D, Montresor A et al. *Strongyloides stercoralis*

Caramaschi P, Marocco S, Gobbo M et al. Systemic lupus erythematosus and strongyloidiasis: a multifaceted connection. *Lupus* 2010; 19(7):872-874.

Carmo AM, Vicentini MA, Dias AT et al. Increased susceptibility to *Strongyloides venezuelensis* in mice due to *Mycobacterium bovis* co-infection modulates production of Th2 cytokines. *Parasitology* 2009; 136 (11): 1357-1365.

Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL et al. *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2007; 49(3):147-153.

Copelovitch L, Sam O, Taraquinio S. Childhood nephrotic syndrome in Cambodia: an association with gastrointestinal parasites. *J Pediatr* 2010. 156: 76-81.

Costa-Cruz JM, Madalena J, Silva DAO et al. Heterologous antigen extract in ELISA for the detection of human IgE anti- *Strongyloides stercoralis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2003; 45 (5): 265-268.

Cremades Romero MJ, Pellicer Ciscar C, Menéndez Villanueva R et al. *Strongyloides stercoralis* infection in patients with bronchial obstructive pathology. *Arch Bronconeumol* 1997; 33 (8): 384-388.

Cruz T, Rebouças G, Rocha H et al. Fatal strongyloidiasis in patients receiving corticosteroids. *NEJM* 1966; 275:1093-1096.

Davidson RA, Fletcher RH, Chapman LE et al. Risk factors for strongyloidiasis. A case control study. *Arch Intern Med* 1984; 144: 321-324.

De Bona S, Basso RMC. Hyperinfection by *Strongyloides stercoralis* associated with chronic use of corticosteroid. Rev Bras Anal Clin 2008; 40 (4): 247-250.

De Paula FM, Castro E, Gonçalves-Pires MRF et al. Parasitological and immunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 2000; 42 (1): 51-55.

De Souza JN, Machado PR, Teixeira MC et al. Recurrence of *strongyloides stercoralis* infection in a patient with Hansen's disease: a case report. Lepr Rev 2014 85(1):58-62.

Dorris M, Blaxter M. The small subunit ribosomal RNA sequence of *Strongyloides stercoralis*. Int J Parasitol 2000; 30: 939-941.

Faust EC. Experimental studies on human and primate species of *Strongyloides*: II- the development of *Strongyloides* in the experimental host. Am. J. Hyg 1933; 16:114-132.

Faust EC. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communications. Am J Trop Med 18:169-183.

Faust EC, Groat. A. Internal autoinfection in human strongyloidiasis. Am. J. Trop Med 1940; 20:359-371.

Furtado KC, Costa CA, Ferreira Lde S et al. Occurrence of strongyloidiasis among patients with HTLV-1/2 seen at the outpatient clinic of the Núcleo de Medicina Tropical, Belém, State of Pará, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2013; 46(2):241-243.

George PJ, Anuradha R, Kumar NP et al. Helminth infections coincident with active pulmonary tuberculosis inhibit mono- and multifunctional CD4+ and CD8+ T cell responses in a process dependent on IL-10. Plos Pathoq 2014; 11;10(9) 1004375.

Graeff-Teixeira C, Leite CSM, Sperhacke, CL et al. Prospective study of strongyloidiasis in patients with hematologic malignancies. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1997; 30 (3): 355-357.

Genta RM. Dysregulation of strongyloidiasis: a new hypothesis. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5: 345-355.

Gonçalves AJR, Lima, SMR, Lazera, MS et al. Estrongiloidíase disseminada: a propósito de um caso fatal. *Arq Bras Med* 1983; 57:241-244.

González A, Gallo M, Valls ME et al. Clinical and epidemiological features of 33 imported *Strongyloides stercoralis* infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2010;104:613-616.

Gonzalez-Ibarra F, Chevli P, Schachter L, Kaur M, Eivaz-Mohammadi S, Tashtoush B et al. Strongyloidiasis and diffuse alveolar hemorrhage in a patient with systemic lupus erythematosus. *Case Rep Med* 2014.

Harada U, Mori, O. A new method for culturing hookworm. *Yonago Acta Medica* 1955. (1): 177-179.

Hasegawa H, Modrý D, Kitagawa M et al. Molecular identification of the causative agent of human strongyloidiasis acquired in Tanzania: dispersal and diversity of *Strongyloides spp.* and their hosts. *Parasitol. Int* 2010; 59: 407-413.

Hirata T, Uchima N, Kishimoto K et al. Impairment of host immune response against strongyloides stercoralis by human T cell lymphotropic virus type 1 infection. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74: 246–249.

Iñiguez AM, Santos CP, Vicente AC. Genetic characterization of *Anisakis typica* and *Anisakis physeteris* from marine mammals and fish from the Atlantic Ocean off Brazil. *Veterinary Parasitology* 2009; 165: 350-356.

Iwashita Y, Suzuki K, Masui A et al. A case of *Strongyloides* hyperinfection associated with tuberculosis. *Journal of Intensive Care* 2013; 1:7.

Izquierdo I, Briones J, Lluch et al. Fatal *Strongyloides* Hyperinfection Complicating a Gram-Negative Sepsis after Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Hematol* 2013.

Jongwutiwes U, Waywa D, Silpasakorn S et al. Prevalence and risk factors of acquiring *Strongyloides stercoralis* infection among patients attending a tertiary hospital in Thailand. *Pathog Glob Health* 2014; 108(3):137-140.

Jeyamani R, Joseph AJ, Chacko A et al. Severe and treatment resistant strongyloidiasis--indicator of HTLV-I infection. *Trop Gastroenterol* 2007; 28(4):176-177.

Kato K. A correct application of the thick – smear technic with cellophane paper cover. *A Pamphlet* 1960; 1-9.

Khan WA, Santhanakrishnan K. Hypereosinophilic syndrome secondary to strongyloides infection: a case of recurrent asthma exacerbations. *BMJ Case Reports* 2013; 20.

Khieu V, Schär F, Marti H et al. Diagnosis, Treatment and Risk Factors of *Strongyloides stercoralis* in Schoolchildren in Cambodia. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2013; 7 (2): 2035.

Kiyota M. Regulatory role of testosterone on the natural defence mechanism against infection with *Strongyloides ratti* in C57BL/6 mice. *Jpn J Parasitol* 1984; 33: 49-54.

Koosha S, Fesharaki M, Rokni MB. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis of human strongyloidiasis. *Indian J Gastroenterol* 2004. 23(6): 214-216.

Kozubsky L, Archelli S. Consideraciones sobre la biología y el diagnóstico de *Strongyloides stercoralis*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 2004; 38 (3): 333-338.

Kramme S, Nissen N, Sobliket H et al. Novel real-time PCR for the universal detection of *Strongyloides spp.* Journal of Medical Microbiology 2011; 60: 454–458.

Leyva LM, González-Carbajal MP, Villafranca RC et al. Diagnóstico y tratamiento de la estrogiloidosis. Revista Cubana de Medicina Militar 2011; 40: 157-167.

Liepmann M. Disseminated *Strongyloides stercoralis*. A complication of immunosuppression. JAMA 1975; 231:387-388.

Lim S, Kevin K, Kraiden S et al. Complicated and fatal *Strongyloides* infection in Canadians: risk factors, diagnosis and management. Canadian Medical Association Journal 2004; 171: 479-484.

Liu LX, Weller PR 1993. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. Infectious Disease Clinics of North America: 7 655-682.

Marra NM, Chiuso-Minicucci F, Machado GC et al. Faecal examination and PCR to detect *Strongyloides venezuelensis* in experimentally infected Lewis rats. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2010; 105(1): 57-61.

Massoud AM, El-Shazly AM, Awad SE et al. New trends in diagnosis and treatment of chronic intestinal strongyloidiasis stercoralis in Egyptian patients. J. Egypt Soc Parasitol 2006; 36(3):827-844.

Montes M, Sanchez C, Verdonck K et al. Regulatory T cell expansion in HTLV-1 and strongyloidiasis co-infection is associated with reduced IL-5 responses to *Strongyloides stercoralis* antigen. PLoS Negl Trop Dis 2009; 3: 456.

Montes M, Sawhney C, Barros N. *Strongyloides stercoralis*: there but not seen. Curr Opin Infect Dis 2010; 23: 500–504.

Mora CS, Segami MI, Hidalgo JA et al. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in systemic lúpus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 2006; 36(3):135-43.

Naidu P, Yanow SK, Kowalewska-Grochowska KT. Eosinophilia: A poor predictor of *Strongyloides* infection in refugees. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2013; 24(2):93-6.

Neumann I, Ritter R, Mounsey A. *Strongyloides spp* as a Cause of Fever of Unknown Origin. *J Am Board Fam Med* 2012; 25 (3): 390-393.

Norsarwany M, Abdelrahman Z, Rahmah N et al. Symptomatic chronic strongyloidiasis in children following treatment for solid organ malignancies: case reports and literature review. *Trop Biomed* 2012; 29(3):479-488.

Oliveira LCM, Ribeiro CT, Mendes DM et al. Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(1): 119-121.

Paraná R, Portugal M, Vitvitski L et al. Severe strongyloidiasis during interferon plus ribavirin therapy for chronic HCV infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12(2):245-246.

Paboriboune P, Phoumindr N, Borel E et al. Intestinal parasitic infections in HIV-infected patients, Lao People's Democratic Republic. *PLoS One* 2014; 9(3):24.

Paula FM, Costa-Cruz JM. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. *Parasitology* 2011; 138: 1331–1340.

Paula FM, Castro E, Gonçalves-Pires MRF et al. Parasitological and immunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2000; 42 (1): 51-55.

Pires ML, Dreyer G. Revendo a Importância do *Strongyloides stercoralis*. Ver Hosp Clin Fac Med S Paulo 1993; 48(4): 175-182.

Purtilo DT, Meyers AM, Connor DH. Fatal strongyloidiasis in immunosuppressed patients. Am J Med 1974; 56:488-493.

Rajadhyaksha A, Mehra S, Kawale J. Disseminated Strongyloides in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibody syndrome: a case report. Int J Rheum Dis 2012; 15(6):159-161.

Rialch A, Vatsya S, Kumar RR. Detection of benzimidazole resistance in gastrointestinal nematodes of sheep and goats of sub-Himalayan region of northern India using different tests. Veterinary Parasitology 2013; 198: 312-318.

Ribeiro LC, Rodrigues-Junior ENA, Silva MD et al. Púrpura em paciente com estrogiloidíase disseminada. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38 (3): 255-257.

Rivera E, Maldonado N, Velez-Garcia E et al. Hyperinfection syndrome with *Strongyloides stercoralis*. Ann Intern Med 1970; 72: 199-204.

Rogers Jr W, Bill N. Strongyloidiasisans malignant lymphoma, "opportunistic infection" by a nematode. The Journal of the American Medical Association 1966; 195:685-687.

Sadjadi SA, Damodaran C, Sharif M. *Strongyloides stercoralis* infection in transplanted patients. Am J Case Rep 2013; 14:205-209

Salles F, Bacellar A, Amorim M et al. Treatment of strongyloidiasis in HTLV-1 and Strongyloides stercoralis coinfecting patients is associated with increased TNF α and decreased soluble IL2 receptor levels. Trans R Soc Trop Med Hyg 2013; 107(8):526-9

Salim N, Schindler T, Abdul U et al. Enterobiasis and strongyloidiasis and associated co-infections and morbidity markers in infants, preschool-and school-aged

children from rural coastal Tanzania: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2014; 14(1):644.

Satoh M, Toma H, Sato Y et al. Reduced efficacy of treatment of strongyloidiasis in HTLV-I carriers related to enhanced expression of IFN-gamma and TGF-beta1. *Clin Exp Immunol* 2002; 127: 354–359.

Saugar JM, Merino FJ, Martin-Rabadan P et al. Application of real-time PCR for the detection of *Strongyloides spp.* In clinical samples in a reference center in Spain. *Acta Trop* 2015; 142:20-25.

Schär F, Trostorf U, Giardina F et al. *Strongyloides stercoralis*. Global Distribution and Risk Factors. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7 (7): 2288.

Setoyama M, Fukumaru S, Takasaki T et al. SLE com a morte por hemorragia pulmonar maciça aguda causada por estrogiloidíase disseminada. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 1997; 26(5): 389-391.

Sharifidini M, Mirhendi H, Ashrafi K et al. Comparison of Nested Polymerase Chain Reaction and Real-Time Polymerase Chain Reaction with Parasitological Methods for Detection of *Strongyloides stercoralis* in Human Fecal. *Am J Trop Med Hyg* 2015; 93(6): 1285-91.

Shorman, M, Al-Tawfiq, JA. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection presenting as acute respiratory failure and Gram-negative sepsis in a patient with astrocytoma. *International Journal of Infectious Diseases* 2009; 13: 288-291.

Siddiqui AA, Berck SL. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* Infection. *Clinical Infectious Diseases* 2001; 33:1040–1047.

Siegel MO, Simon GL. Is Human Immunodeficiency Virus Infection a risk factor for *Strongyloides stercoralis* hyperinfection and dissemination. *Plos Negl Trop Dis* 2012; 6(7):1581.

Sitta RB, Malta FM, Pinho JR et al. Conventional PCR for molecular diagnosis of human strongyloidiasis. *Parasitology* 2004; 141(5): 716-721.

Sithithaworn P, Srisawangwong T, Tesana S. Epidemiology of *Strongyloides stercoralis* in north-east Thailand: application of the agar plate culture technique compared with the enzyme-linked immunosorbent assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg* London 2003; 97 (4): 398-402.

Steinmann P, Zhou XN, Du ZW et al. Occurrence of *Strongyloides stercoralis* in Yunnan Province, China, and comparison of diagnostic methods. *PLoS Negl Trop Dis* 2007; 1(1):75

Sudré AP. Diagnóstico da estrogiloidíase humana: importância e técnicas. *Rev Pat Trop Goiana* 2006; 35 (3):173-184.

Teixeira ATLS. *Strongyloides stercoralis*: frequência em exames parasitológicos do Hospital de Clínicas da UNICAMP e análise morfométrica das larvas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1997; 30: 75-76.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 4876–4882.

Tiyo R, Guedes TA, Falavigna DLM et al. Seasonal contamination of public squares and lawns by parasites with zoonotic potential in southern Brazil. *J Helminthol* 2008; 82: 1-6.

Valverde, JG, Gomes-Silva A, De Carvalho Moreira CJ et al. Prevalence and epidemiology of intestinal parasitism, as revealed by three distinct techniques in an endemic area in the Brazilian Amazon. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 2011; 105 (6): 413-424.

Yunnan province, China, and comparison of diagnostic methods. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2007; 1 (75).

Yung EE, Lee CM, Boys J et al. Strongyloidiasis Hyperinfection in a Patient with a History of Systemic Lupus Erythematosus. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 91(4):806-809.

Zaha O, Hirata T, Kinjo F et al. Strongyloidiasis – Progress in diagnosis and treatment. *Internal Med* 2000; 39: 695-700.

Zago-Gomes MP, Perazzio SF, Gonçalves CS et al. Prevalence of intestinal nematodes in alcoholic patients. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35(6): 571-574.