

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS PARA O DIAGNÓSTICO DE
Strongyloides stercoralis EM INDIVÍDUOS INFECTADOS E NÃO INFECTADOS
PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA**

JUCELENE MARCHI BLATT

FLORIANÓPOLIS
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS PARA O DIAGNÓSTICO DE
Strongyloides stercoralis EM INDIVÍDUOS INFECTADOS E NÃO INFECTADOS
PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA**

JUCELENE MARCHI BLATT

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmácia

Orientadora:

Prof^a Dra. Geny Aparecida Cantos

FLORIANÓPOLIS
2003

FOLHA DE APROVAÇÃO

O meu reconhecimento, ao meu marido José Agostinho, a minha filha Camila, pela compreensão, amor, dedicação e solidariedade nos momentos difíceis da realização deste trabalho.

Ao meu pai Remígio Marchi (in memorium), e a minha mãe Wanda Zunino Marchi, pelo amor e exemplo de dignidade.

Aos meus irmãos, pelo carinho e presença constantes.

AGRADECIMENTOS

À coordenação de Pós-graduação em nome da Dr^a Tânia Fröde, pela sua competência e dedicação.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de participar deste curso.

À Universidade do Vale do Itajaí, pelo apoio na realização deste trabalho.

À minha orientadora, Geny Aparecida Cantos, pela orientação neste estudo.

Aos indivíduos portadores do HIV, pela colaboração e participação neste trabalho.

Aos profissionais do Hospital Dia de Itajaí, e do Laboratório Municipal de Itajaí, pelo apoio e orientação aos pacientes.

Aos colegas bioquímicos dos Laboratórios Municipal e UNIVALI, pelo companheirismo, e apoio, quando da minha ausência.

À Josimari Telino Lacerda, pela sua competência e dedicação em conduzir a análise estatística.

Ao professor Nivaldo Diegolli, pelo profissionalismo, e revisão metodológica.

Aos professores, Cimerman, Henry, Lenilza e Maria Cristina pelas considerações ao trabalho.

Ao professor Davi pelo trabalho fotográfico.

A todos aqueles que direta ou indiretamente auxiliaram na elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 <u>Biologia do <i>Strongyloides stercoralis</i></u>	04
2.1.1 Ciclo biológico.....	04
2.1.2 Fatores regulatórios envolvidos nos ciclos.....	05
2.1.3 Ciclo direto e indireto	06
2.1.4 Representação das fases evolutivas de <i>S. stercoralis</i>	07
2.2 <u>Mecanismo de transmissão</u>	10
2.3 <u>Manifestações clínicas</u>	10
2.3.1 <u>Estrongiloidíase disseminada</u>	12
2.4 <u>Imunobiologia do <i>Strongyloides stercoralis</i></u>	13
2.5 <u>Parasitoses intestinais e a infecção pelo HIV</u>	14
2.5.1 <u>Mecanismo de Infecção e imunossupressão pelo HIV</u>	14
2.5.2 <u>Citometria de fluxo</u>	16
2.5.3 <u>Parasitas intestinais e o HIV</u>	17
2.6 <u>Epidemiologia do <i>Strongyloides stercoralis</i></u>	19
2.7 <u>Métodos parasitológicos de fezes</u>	19
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 <u>Objetivo geral</u>	22
3.2 <u>Objetivos específicos</u>	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 <u>Amostras</u>	23
4.2 <u>Métodos</u>	24
4.2.1 <u>Método de Ritchie</u>	24
4.2.2 <u>Método de Hoffman, Pons e Janer</u>	24
4.2.3 <u>Método de Baermann-Moraes</u>	25
4.2.4 <u>Método de Harada-Mori</u>	26
4.2.5 <u>Método de cultura em placa</u>	27
4.2.6 <u>Contagens de linfócitos T CD4/CD8</u>	28
4.2.7 <u>Análise estatística</u>	30
5 RESULTADOS	31
6 DISCUSSÃO	36
7 CONCLUSÕES	45
8 REFERÊNCIAS	46
9 ANEXOS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo evolutivo de <i>Strongyloides stercoralis</i>	06
Figura 2. Fêmea partenogenética	07
Figura 3. Ovo de <i>S. stercoralis</i>	07
Figura 4. Macho de <i>S. stercoralis</i> de vida livre.....	08
Figura 5. Larva rabditóide	08
Figura 6. Larva filarióide	09
Figura 7. Larva filarióide	09
Figura 8. Método de Ritchie e Hoffman, Pons e Janer	25
Figura 9. Método de Baermann-Moraes.....	26
Figura 10. Método de Harada-Mori	27
Figura 11. Método de cultura em placa.....	28
Figura 12. Citômetro de fluxo.....	29
Figura 13. Tubos de reações	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição dos indivíduos HIV-positivos e HIV-negativos, segundo faixa etária. Itajaí, set/2001 a junho/2002.....	31
Tabela 2.	Distribuição dos indivíduos HIV-positivos e HIV-negativos, segundo sexo. Itajaí, set/2001 a junho/2002	31
Tabela 3.	Percentual de parasitas intestinais, nos indivíduos HIV-positivos (n=211) e HIV-negativos (n=213). Itajaí, set/2001 a junho/2002.....	32
Tabela 4.	Freqüência de parasitas intestinais em indivíduos HIV-positivos (n=211) e indivíduos HIV-negativos (n =213). Itajaí, set/2001 a junho/2002.	32
Tabela 5.	Freqüência de larvas de <i>Strongyloides stercoralis</i> entre as parasitoses na população parasitada do grupo HIV-positivo e HIV-negativo. Itajaí, set/2001 a junho/2002.....	33
Tabela 6.	Comparação das análises parasitológicas na identificação dos enteroparasitas, utilizando diferentes métodos. Itajaí, set/2001 a junho/2002	33
Tabela 7.	Comparação da eficácia do método cultura em placa na identificação de larvas de <i>Strongyloides stercoralis</i> , em relação aos demais métodos utilizados em indivíduos HIV-positivos e HIV-negativos, através do teste de proporção simples. Itajaí, set/2001 a junho/2002.....	34
Tabela 8.	Ocorrência de Estrongiloidíase segundo as contagens de células TCD4 ⁺ no grupo de indivíduos HIV-positivos. Itajaí, set/2001 a junho/2002.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS.....	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
cm	centímetros
CCR5	Co-Receptor para linhagem M-Trópica do HIV
CD.....	Cluster of differentiation
CD4.....	Linfócitos T com receptores do tipo CD4
CD8.....	Linfócitos T com receptores do tipo CD8
CXCR4	Co-receptor para linhagem T-trópica do HIV
cDNA.....	Ácido desoxirribonucléico complementar
DNA.....	Ácido desoxirribonucléico
ELISA.....	Enzime Linked Imunossorbent Assay
Env.....	Envelope
g.....	gramas
gap.....	gene codificador das proteínas do core viral
gp120	glicoproteína de superfície do envelope viral
gp41	glicoproteína transmembrana
HIV.....	Vírus da Imunodeficiência Humana
Ig.....	Imunoglobulina
IL.....	Interleucina
IFN-γ.....	Interferon gama
L.....	Larvas
μm	micrômetros
ml.....	mililitro
mm ³	milímetros cúbicos
<i>S. stercoralis</i>	<i>Strongyloides stercoralis</i>
RCF.....	Relative centrifugal force
RNA.....	Ácido ribonucléico
TNF	Fator de necrose tumoral
Univali	Universidade do Vale do Itajaí

RESUMO

O *S. stercoralis* é um nematóide endêmico no Brasil, e em pacientes imunocomprometidos pode causar infecção disseminada fatal. O presente estudo teve como objetivo, verificar a ocorrência de estrogiloidíase em dois grupos de indivíduos e comparar a eficácia do método de cultura em placa com as demais metodologias empregadas no diagnóstico deste parasita. Assim, um total de 424 amostras fecais, foram examinadas, no período entre setembro de 2001 a junho de 2002, na cidade de Itajaí-S.C. O primeiro grupo constituído de 213 indivíduos atendidos no Laboratório Escola de Análises Clínicas da UNIVALI, e o segundo por 211 indivíduos HIV-positivos, atendidos no Hospital Dia. Participaram desta pesquisa indivíduos de ambos os sexos e com idade acima de 18 anos. Foram realizadas também as contagens de linfócitos T CD4+ de 185 participantes do grupo HIV-positivo. As amostras fecais foram analisadas pelos métodos de Hoffman, Ritchie, Baermann-Moraes, cultura em placa e Harada-Mori. Os resultados obtidos demonstraram que o parasita *S. stercoralis* foi o helminto mais freqüente nos dois grupos avaliados, e entre a população parasitada observou-se que nos indivíduos com HIV, ocorreu maior prevalência deste parasita ($or=5,687$). Considerando os métodos parasitológicos, observou-se maior eficácia no encontro das larvas deste helminto pelo método cultura em placa (69,7%), seguido dos métodos de Baermann e Ritchie (48,5%), Hoffman (42,4%), e Harada-Mori (24%). Comparativamente o método de cultura em placa foi significativamente superior ao método de Baermann e Ritchie $p=0,03$, ao Hoffman $p=0,01$ e ao Harada-Mori $p=0,001$. Na contagem de linfócitos T CD4+, podemos observar uma significativa tendência de aumento da ocorrência de estrogiloidíase à medida que diminuem as contagens de linfócitos no grupo HIV. Desta forma, o método de cultura em placa foi o mais eficaz no encontro de larvas de *S. stercoralis*, e sua maior ocorrência em indivíduos HIV positivos, sugere a necessidade de métodos mais eficazes para o diagnóstico desta helmintíase, especialmente em pacientes imunocomprometidos.

Palavras-chave: Cultura em placa, HIV, *Strongyloides*

ABSTRACT

Strongyloides stercoralis is a nematode which is endemic in Brazil and, in immunocompromised patients, can cause disseminated fatal infection. The objective of this study is to examine the occurrence of strongyloidiasis in two groups of individuals and compare the effectiveness of the agar plate culture method with another methods used in the diagnosis of this parasite. A total of 424 stool samples were examined, during the period between September 2001 and June 2002, in Itajaí city, Santa Catarina state, Brazil. The first group was composed by 213 individuals who attended the Student Clinical Analysis Laboratory at UNIVALI, and the second was composed 211 individuals who were infected by human immunodeficiency virus, and attended the Dia Hospital. The individuals were of both genders and over 18 years of age. Lymphocyte counts T CD4+ were carried out on 185 participants of the HIV-positive group. The fecal samples were analyzed using the Hoffman, Ritchie, Baermann-Moraes, agar plate culture and Harada-Mori methods. The results obtained demonstrated that the parasite *S. stercoralis* was the most frequently-occurring helminth in the two groups evaluated. Among the parasitized population, it was observed that a higher prevalence of this parasite ($OR=5.6687$) occurred among the individuals infected by HIV. In terms of the parasitological methods, it was observed that was the most effective on finding the larvae of this helminth the plate culture method (69.7%), followed by the Baermann and Ritchie (48.5%), Hoffmann (42.4%) and Harada-Mori (24%) methods. Comparatively, the agar plate culture method was significantly superior to the Baermann and Ritchie $p=0,03$ the Hoffman $p=0.01$ and the Harada-Mori $p=0.001$ methods. On the evaluation of lymphocytes T CD4+, it was observed a significant trend towards an increase in the occurrence of strongyloidiasis, as the lymphocyte counts are reduced in the HIV group. Thus, the agar plate culture method was the most effective for finding *S. stercoralis* larvae and its highest occurrence was in HIV positive patients, which suggests that it is extremely important to study methods more effective for the diagnosis of this parasitoses, especially on immunocompromised patients.

Key words: Agar Culture Plate, HIV, *Strongyloides*.

1 INTRODUÇÃO

A estrogiloidíase é uma doença causada por um nematelminto do gênero *Strongyloides*, que está amplamente distribuído nos trópicos e sub-trópicos (NOZAIS et al., 2001; TRIONE et al., 2001). Este helminto foi descoberto por Louis Normand, em 1876, e as espécies de importância clínica são: *Strongyloides stercoralis* de distribuição mundial, *Strongyloides fuelleborni* encontrado na África e na Ásia e *Strongyloides fuelleborni-like* isolado na ilha de Nova Guiné (SIDDIQUI; BERK, 2001). O principal hospedeiro é o homem, embora possa ser encontrado menos freqüente no cão, gato, porco, macaco, e roedores (MOZZATTO et al., 1999).

A infecção causada por este helminto, normalmente é assintomática ou oligossintomática. Contudo, se houver comprometimento do sistema imune, especialmente da imunidade celular, a forma de apresentação dessa doença pode ser mais grave, podendo ocorrer exacerbação dos mecanismos de auto-infecção (SALAZAR et al., 1995; TRAJMAN et al., 1997; FALLAS et al., 2000).

O *S. stercoralis*, em algumas situações especiais, possui algumas peculiaridades como o desenvolvimento rápido de larvas deste helminto no interior do intestino e a disseminação das mesmas para as circulações pulmonares e sistêmicas no hospedeiro, por meio da auto-infecção. Estes fenômenos originaram os termos estrogiloidíase sistêmica, estrogiloidíase disseminada ou hiperinfecção (CELEDON et al., 1994), cuja mortalidade pode chegar a ser de 50 a 75% (LESSNAU et al., 1993; STRATTON, 2000).

Há relatos de casos fatais de estrogiloidíase disseminada descritos em pacientes com neoplasias hematológicas, com síndrome nefrótica, com desnutrição protéico-calórica, no alcoolismo crônico, na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), e também em pacientes que fazem uso prolongado de corticóides e drogas imunossupressoras (TABACOF et al., 1991; DIAS et al., 1992; PATIL et al., 1999; TRIONE et al., 2001).

Estudos imunológicos e biológicos realizados em indivíduos HIV-positivos têm mostrado que a morbidade, provocada especialmente por criptosporidiose,

isosporfase e, às vezes, na estrogiloidíase é de grande relevância, mostrando evidências da predisposição destes indivíduos a severas manifestações clínicas ocasionadas por estas parasitoses (HEYWORTH, 1996). Considera-se ainda que estes parasitas desencadeiam diferentes aspectos fisiopatológicos no organismo do hospedeiro, provocando sintomas nem sempre distintos (WAYNA et al., 2001).

Assim, é importante que se utilize diferentes métodos no diagnóstico de parasitoses intestinais considerando a biologia do parasita a ser pesquisado. Rotineiramente utiliza-se o exame parasitológico de fezes, levando-se em consideração as vantagens relacionadas sobretudo, à sensibilidade, custo e praticidade.

Em relação ao *S. stercoralis*, devido à biologia deste helminto, o diagnóstico é realizado pelo encontro das larvas nas fezes. Entretanto, a oviposição pela fêmea é pequena no epitélio intestinal em relação a outros helmintos, e a frequência de excreção das larvas na infecção moderada às vezes é mínima e irregular (NEVES, 2002; SATO et al., 1995), necessitando, portanto, de métodos mais sensíveis para sua detecção (HERNANDEZ-CHAVARRIA, 2001). Estes dados demonstram, portanto, a necessidade da busca de novas metodologias para o diagnóstico deste helminto (FELTZ et al., 1999).

Por outro lado, o reconhecimento das formas larvárias distintas de nematóides, especialmente de *S. stercoralis*, de ancilostomídeos e de *Trichostrongylus spp*, é de suma importância para o diagnóstico correto dessas helmintoses, especialmente quando se consideram fezes envelhecidas ou de pacientes constipados.

Os métodos tradicionalmente utilizados na detecção de larvas de helmintos descritos, são os de Baermann e Rugai. O método de Harada-Mori é raramente utilizado (KOGA et al., 1990). Segundo Salazar et al., (1995), embora o método de Ritchie (formalina-acetato de etila) seja utilizado com frequência, este não apresenta uma sensibilidade adequada no encontro de larvas de nematóides.

No início da década de 1990, foram descritos os primeiros informes sobre um novo método para pesquisa de *S. stercoralis*, baseando-se no cultivo das larvas dos nematóides que arrastavam as bactérias fecais, conhecido como “cultivo em placa de agar” (ARAKAKI et al., 1990). Estudos comparativos entre este novo método e outras técnicas como de Baermann-Moraes, Harada-Mori, métodos de concentração como Hoffman, Ritchie, Faust (flutuação) têm sido realizados (KOGA et al., 1991;

KAMINSKY, 1993; SALAZAR et al., 1995; CANTOS et al., 1998; JONGWUTIWES et al., 1999; UPARANUKRAW et al., 1999).

Apesar do método cultura em placa ter um custo um pouco mais elevado em relação aos demais citados, e o diagnóstico demorar em torno de 48 horas, sua eficácia parece ser superior às demais metodologias no encontro de larvas de *S. stercoralis* (SIDDIQUI; BERK, 2001), justificando a realização do mesmo em casos de suspeita deste helminto em doenças que possam levar a imunossupressão ou em indivíduos que tenham que fazer uso de corticóides.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biologia do *Strongyloides stercoralis*

2.1.1 Ciclo biológico

A fêmea partenogenética tem como habitat as criptas de Lieberkuhn do duodeno e porção posterior do jejuno. Em infecções maciças podem ser encontradas desde o piloro até o intestino grosso, sendo que as localizações ectópicas mais frequentes são: estômago, traquéia e brônquios (BATISTA et al., 2001).

Após a postura dos ovos pela fêmea adulta na intimidade da mucosa do intestino delgado, esta elimina as larvas rhabditóides na própria mucosa intestinal, que são eliminadas para o meio externo pelas fezes. Em condições favoráveis, após 24-36 horas, transformam-se em larvas filarióide infectantes (CIMERMAN; CIMERMAN, 2001).

As larvas infectantes ao penetrarem na pele, migram pela corrente sangüínea até o pulmão e neste órgão ultrapassam os capilares pulmonares, atravessando a membrana alveolar. Em seguida, as mesmas ascendem à árvore respiratória até a faringe, são deglutidas e na mucosa do intestino delgado, entre 17 e 21 dias, atingem maturação final, transformando-se em fêmeas adultas partenogenéticas, caracterizando assim o ciclo direto. As modificações morfofisiológicas das larvas rhabditóides é que vão resultar no desenvolvimento do ciclo direto ou indireto (PIRES; DREYER, 1993; STRATTON, 2000).

O *Strongyloides stercoralis* possui uma vantagem biológica adicional, que é a sua capacidade de desenvolver-se no solo através das formas adultas livres, produzindo mais larvas, e aumentando com isso, as chances de sua sobrevivência (GENTA, 1984).

Assim, as larvas rabditóides, no solo, evoluem em machos e fêmeas de vida livre (ciclo indireto) e após a cópula a fêmea inicia a oviposição. Os ovos no solo e em condições favoráveis de temperatura e umidade, tornam-se embrionados. As larvas rabditóides eclodem, e podem se transformar em filarióides infectantes (NEVES, 1997).

2.1.2 Fatores regulatórios envolvidos nos ciclos

São vários os fatores regulatórios que podem estar envolvidos na vida parasitária do *S. stercoralis*. A fertilidade e a produção de ovos poderiam ser afetadas pelos próprios parasitas ou pelo hospedeiro, por meio de respostas imunes específicas (GENTA, 1992). No estágio de larva L1 e L2 no lúmen do intestino delgado, sua sobrevivência também poderá ser afetada pela disponibilidade de nutrientes apropriados e por outras condições hospedeiro-dependentes, como a hipocloridria (PIRES; DREYER, 1993).

Os fatores que determinam a existência desses ciclos são dependentes das condições de temperatura, que entre 16-21°C favorecem o ciclo direto e superior a 20°C o ciclo indireto, da umidade do solo (NOZAIS et al., 2001), e da constituição cromossômica das larvas (NEVES, 1997). Estudos citológicos realizados com *Strongyloides ratti* mostraram que a reprodução deste parasita é do tipo partenogênese mitótica, havendo uma geração de fêmeas parasitas geneticamente idênticas (VINEY, 1999). Por outro lado, no ciclo de vida livre o processo de reprodução é por pseudogamia, onde o esperma estimula o desenvolvimento dos ovos, mas a herança genética é só materna (PIRES; DREYER, 1993; VINEY, 1999).

Estudos sugerem ainda que as fêmeas partenogênicas podem gerar três variedades genéticas de larvas rabditóides: uma que daria origem uma gênese de machos de vida livre, outras de fêmeas de vida livre e uma terceira geração pelo caminho homogônico (NEVES, 2002).

2.1.3 Ciclo direto e indireto

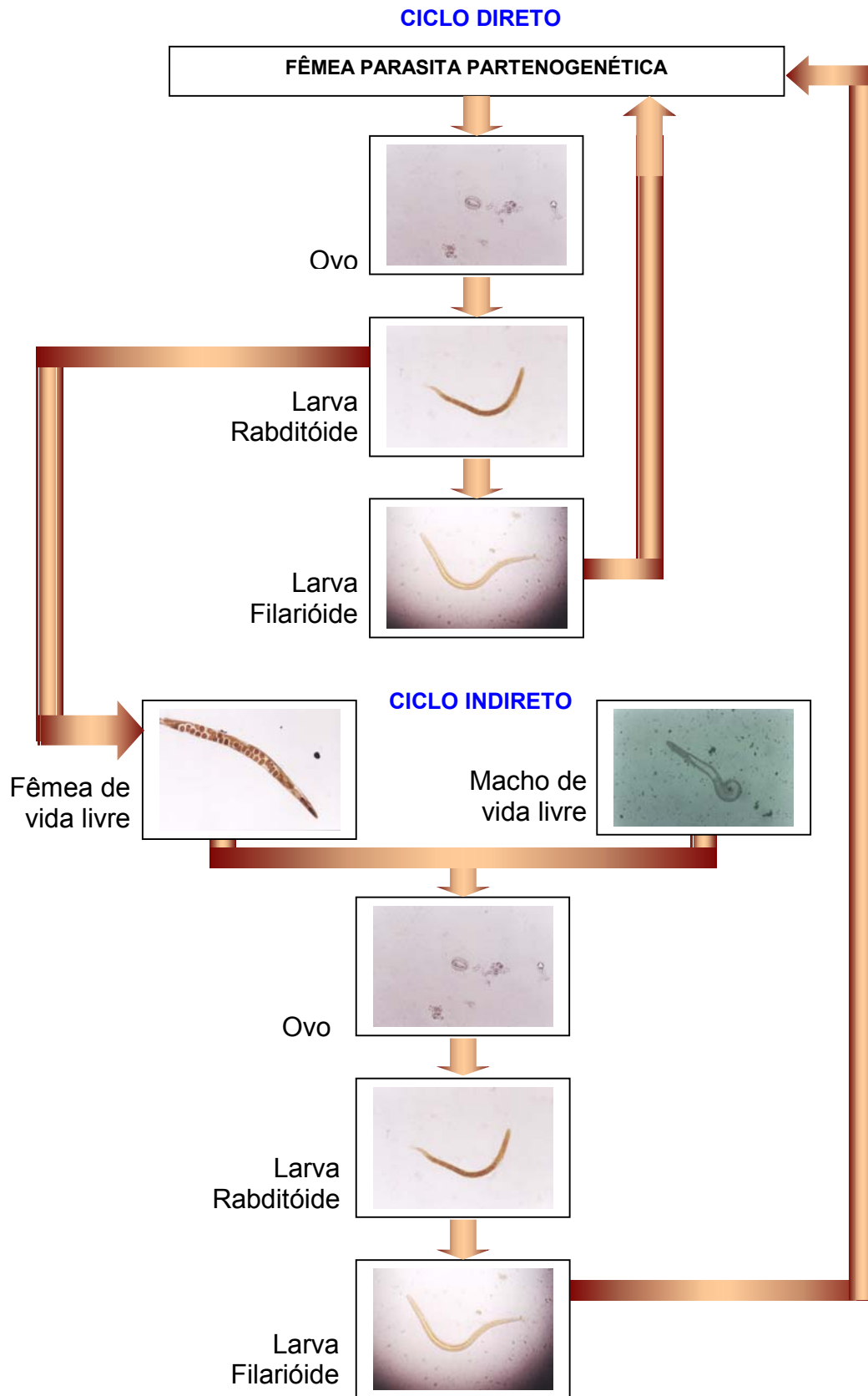


Figura 1: Ciclo evolutivo de *Strongyloides stercoralis*.
 Fonte: adaptado de Cimermann & Cimermann, 2001 (Fotos originais)

2.1.4 Representação das fases evolutivas de *S. stercoralis*



FIGURA 2: Fêmea de vida livre encontrada pelo método cultura em placa após 48 horas de incubação. A. boca; B. esôfago rabditóide; C. anel nervoso; D. poro excretor; E. intestino; F. ovário; G. útero; H. vulva na região mediana. Aumento 100X. Fotos originais do autor.



FIGURA 3: Ovo larvado de *Strongyloides stercoralis*, parede fina, transparente. Método de cultura em placa, aumento 20X. Fotos originais do autor.



FIGURA 4: Macho de vida livre encontrado no método em cultura. a. Esôfago rabsitóide, b. extremidade posterior recurvada ventralmente. Fotos originais do autor.



FIGURA 5: Larva rabsitóide encontrada no método de cultura. a. Esôfago rabsitóide, b. vestibulo bucal curto, c. primórdio genital nítido na metade da larva. Aumento 20X.



FIGURA 6: Larva filarióide, a. esôfago (cilíndrico, retilíneo), b.cauda entalhada. Método cultura, aumento 20X. Fotos originais do autor.



FIGURA 7: Larva filarióide: nota-se a cauda entalhada. Aumento 40X. Método cultura. Fotos originais do autor.

2.2 Mecanismos de transmissão

Entre os mecanismos de transmissão descritos, a forma de *S. stercoralis* mais freqüente, ocorre pela penetração de larvas infectantes, presentes em solos contaminados, através da pele dos pés, mãos, espaços interdigitais e nádegas, chamado de heteroinfecção ou primoinfecção (MOZZATTO et al., 1999).

Outra forma descrita seria a auto-infecção externa, quando as larvas rabditóides presentes na região perianal transformam-se em larvas filarióides, as quais penetram e alcançam os vasos sangüíneos, os pulmões e o intestino delgado. Essa característica peculiar do ciclo desse parasita permite que o *S. stercoralis* sobreviva por muitos anos no interior do hospedeiro (COOK, 1998; SIDDIQUI; BERK, 2001).

Na auto-infecção interna, a forma de infecção, demonstrada inicialmente por Faust, é característica do *S. stercoralis*, e resulta da transformação da larva rabditóide em filarióide na parede intestinal, onde elas alcançam os vasos sangüíneos e o ventrículo direito. Posteriormente, ocorre um desenvolvimento pulmonar sendo que as larvas sobem a árvore brônquica e são deglutidas, transformando-se em adultos na mucosa do intestino delgado. Essa auto-infecção pode ser grave, cronificando a doença por vários meses e até anos sem que o indivíduo sofra reinfecção (NEVES, 1997; SARANGARAJAN et al., 1997b).

Nesta forma de apresentação da doença pode ocorrer uma exacerbação dos mecanismos de auto-infecção, caracterizada por um aumento do número de larvas filarióides que podem se disseminar em vários órgãos e tecidos do organismo. Quando ocorre tal disseminação, esta doença é denominada de estrogiloidíase sistêmica, disseminada ou hiperinfecção (SARANGARAJAN et al., 1997b).

2.3 Manifestações clínicas

A associação entre lesões de pele, infiltrações pulmonares ou dor abdominal com eosinofilia no sangue periférico sugere a possibilidade de infecção por *S. stercoralis* (MAHMOUD, 1996).

A fase de penetração cutânea das larvas pela pele, determina pouca reação, sendo geralmente assintomática (NOZAI, et al., 2001). Contudo, devido em parte pela produção de proteases pelas larvas, muitas vezes em pessoas sensíveis, pode ocorrer lesão pruriginosa, edema local, pápulas hemorrágicas ou urticária (STRATTON, 2000). A fase cutânea pode ser representada também pela síndrome da larva *currens*, sendo esta patognomônica de estrogiloidíase (HERNÁNDEZ; TOLDOS, 2001). A migração das larvas no tecido subcutâneo, quando estas atravessam a pele da região perianal, afetam mais freqüentemente o tronco, as nádegas, o períneo, a virilha e as coxas (STRATTON, 2000). Nestas regiões as larvas podem permanecer poucas horas, mas podem retornar após um período de semanas, meses ou poucos anos (LIU; WELLER, 1993; MONTERO et al., 1996; IWAMOTO et al., 1998; NOZAI et al., 2001).

As manifestações pulmonares são causadas pela passagem das larvas filarióides pelo pulmão e dependem do grau de infecção. Nas infecções leves os sintomas consistem em tosse seca, dispnéia ou quadros de broncoespasmo semelhante à asma. Ocasionalmente, podem ocorrer manifestações tais como, expectoração, febrícula, dor torácica, infiltrados pulmonares transitórios, hipereosinofilia, e síndrome de Loeffler (HERNÁNDEZ; TOLDOS, 2001). Nos casos graves pode ocorrer ainda ruptura dos capilares alveolares, por uma infecção maciça, com microhemorragias intralveolares, podendo evoluir para broncopneumonia, quadros obstrutivos e inclusive a morte (MAHMOUD, 1996; KINJO et al., 1998).

A fase intestinal pode ser assintomática ou produzir lesões com atrofia da mucosa e infiltração das paredes intestinais, com larvas que também se localizam na luz dos vasos linfáticos e avançam para outros órgãos do corpo. A forma leve é caracterizada por uma enterite catarral, sendo que o intestino se apresenta congestionado, com grande secreção mucosa, hemorragia e pequenas ulcerações. O helminto fica limitado às criptas glandulares (BATISTA et al., 2001). As infecções moderadas produzem sintomas tais como indigestão, dor abdominal, diarreia intermitente, prurido anal e perda de peso (HERNANDEZ-CHAVARRIA, 2001). Na enterite edematosa observa-se edema de submucosa e, posteriormente, desaparecimento de relevo mucoso. A reação inflamatória é mínima e os parasitas são encontrados nas diferentes camadas da mucosa intestinal (BATISTA, et al., 2001). As formas graves são representadas pela enterite ulcerada, tornando a

parede intestinal rígida por edema e fibrose, com ulcerações macroscópicas grosseiras. O infiltrado inflamatório é exuberante devido à invasão bacteriana secundária (VERONESI, 1991).

2.3.1 Strongiloidíase disseminada

Os sintomas insidiosos na hiperinfecção larvária são apresentados como: dor abdominal progressiva, diarréia alternada com constipação. Nas formas graves, causam diarréia ou disenteria intensa, febre, anorexia, náuseas, vômitos, dor abdominal, podendo ocorrer enterite, levando à perda intestinal de proteínas, má-absorção (esteatorréia), íleo paralítico e colite pela invasão larval maciça (LIU; WELLER, 1993; TARANTO, 1995). As infecções bacterianas e fúngicas podem ocorrer decorrentes das ulcerações produzidas, quando as larvas infectantes vencem a barreira mucosa, podendo causar septicemia, meningites e disseminação destes microrganismos para outras partes do corpo, inclusive os pulmões (TABACOF et al., 1991; HARCOURT-WEBSTER et al., 1991; SIDDIQUI; BERK, 2001).

Os mecanismos pelos quais se produz esta infecção endógena não estão totalmente conhecidos, mas a maioria dos casos descritos, são em pacientes que receberam tratamento com agentes imunossupressores ou possuem enfermidade de base debilitante (TABACOF et al., 1991). Estas associações sugerem que a auto-infecção pode ocorrer como resultado de um defeito da imunidade mediada por células. Em casos de hiperinfecção a escassa formação de granulomas nos tecidos, argumentam a favor do papel protetor da imunidade celular (HERNÁNDEZ; TOLDOS, 2001).

Em pacientes com AIDS a síndrome da hiperinfecção provocada por *S. stercoralis* pode apresentar como primeira manifestação clínica a insuficiência pulmonar, associada com opacidades pulmonares e surgimento de larvas no lavado brônquico. O diagnóstico diferencial entre pneumonia por strongiloidíase e outros patógenos oportunistas faz-se necessário (MONTERO et al., 1996).

A hiperinfecção pode também ser favorecida quando a submucosa do intestino perde a capacidade de eliminar as formas adultas de *S. stercoralis*, e

destruir as larvas deste helminto que já penetrou e transita no intestino (NEVA, 1986).

A estrogiloidíase disseminada pode ser desencadeada também pela administração de corticóides. Sendo que, a utilização desta medicação pode levar à depleção dos eosinófilos e também à transformação de larvas rabaditóides em filarióides, e conseqüentemente aumento no número de parasitas (MOZZATTO et al., 1999).

Genta, (1992) e Hernandez-Chavarria, (2001), consideram que pode haver similaridade entre corticóides e os hormônios de ecdysis, que são produzidos nos ovários das fêmeas deste parasita. Estes hormônios conhecidos como ecdisteróides teriam um efeito modulador na transformação das larvas L1 em larvas infectantes.

2.4 Imunobiologia do *Strongyloides stercoralis*

O papel da imunidade celular e humoral frente a este parasita podem ser evidenciados respectivamente pela resposta celular eosinofílica no sangue e tecidos, assim como pela detecção no soro das imunoglobulinas IgG, IgE e IgA. Nos pacientes imunocomprometidos estes mecanismos podem estar suprimidos, levando ao aumento do número de parasitas. A regulação da infecção é dependente dos eosinófilos, linfócitos T auxiliares, citotóxicos e imunidade humoral (SARANGARAJAN et al., 1997b).

Na perspectiva de Herbert et al., (2002), os linfócitos B não são determinantes na resposta imune primária, mas o são na resposta secundária conferindo proteção ao *S. stercoralis*.

A IgA exerce um papel fundamental na imunidade das mucosas, porque esta pode ser seletivamente transportada através das barreiras para dentro do lúmen dos órgãos, neutralizando agentes nocivos (ABBAS et al., 2000). Atkins et al., (1999), ressaltaram a importância da IgA como mecanismo efetor imune na infecção por *Strongyloides*, *Trichuris trichiura*, *Taenia* spp. Esta imunoglobulina parece ser um fator humoral importante na redução da viabilidade dos ovos desses parasitas.

Na estrogiloidíase fulminante, os eosinófilos exercem um papel importante,

embora inespecífico, sendo normalmente encontrados no sangue periférico em indivíduos com sintomas pulmonares (HEYWORTH, 1996). As larvas contêm proteínas que são alergênicas, com isso provocam um aumento na produção de IgE e mastócitos, que degranulam na parede intestinal na presença dos antígenos larvários, e produzem então uma resposta inflamatória com eosinófilos que provocam a expulsão do parasito (HERNÁNDEZ; LÓPEZ- LOYO, 2003).

A imunidade do hospedeiro frente ao parasita parece também ser dependente de interações coordenadas entre os subtipos de linfócitos auxiliares Th1 e Th2, que secretam as interleucinas IL4 e IL5. A ausência de eosinófilos em pacientes com severa estrogiloidíase sugere que esta célula possa estar envolvida na proteção contra disseminação larvária (SAVAGE et al., 1994).

Por outro lado, os mediadores inflamatórios liberados pelos mastócitos, basófilos e eosinófilos podem causar contração do músculo liso, de forma a expelir os parasitas em nível de intestino (PARHAM, 2001).

2.5 Parasitoses intestinais e a infecção pelo HIV

2.5.1 Mecanismo de Infecção e imunossupressão pelo HIV

O HIV foi descrito pela primeira vez no início da década de 80, sendo que pertence ao grupo de retrovírus que causam doenças progressivas. No organismo infecta de forma preferencial as células que expressam moléculas CD4, que possuem os receptores para este vírus. As células-alvo seriam principalmente os linfócitos T auxiliares, mas outras células podem ser infectadas como os macrófagos, monócitos, células da glia, células dendríticas, fibroblastos e células de Langerhans. Os efeitos são devidos principalmente à destruição gradual e sustentada das células T CD4+, que conduz à imunodeficiência profunda provocada pela diminuição progressiva dos linfócitos T auxiliares, conhecida como Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (MURRAY et al., 1997; PARHAM, 2001).

A replicação viral é iniciada por uma adesão da glicoproteína gp 120 do HIV aos receptores CD4, permitindo aos vírions fixar-se nas células. Após o genoma viral fundir-se à membrana celular através de um co-receptor na membrana celular do hospedeiro, identificados como, CCR5 (expresso nas células dendríticas, nos macrófagos e nas células T) e o CXCR4 (que é expresso nas células T) (PARHAM, 2001, p. 267; PROOST; SCHOLS, 2002). Após a interação entre os receptores e co-receptores, a gp41 promove a fusão do vírus à membrana celular, internalizando-o (ROITT, 1994). O vírus perde então o envelope e libera o material nuclear no citoplasma da célula hospedeira. Pela ação da enzima *transcriptase reversa* uma das fitas de RNA é transcrita para DNA. A integrase viral passa a integrar o cDNA no genoma da célula hospedeira, formando um pró-vírus, o qual utiliza a transcrição e tradução da célula do hospedeiro para produzir proteínas virais e genomas de RNA (MURRAY et al., 1997).

A depleção dos linfócitos T auxiliares ocorre devido aos efeitos diretos dos vírus às células infectadas, ocasionando uma redução dos linfócitos circulantes totais e um aumento relativo do número de linfócitos supressores citotóxicos (PEAKMAN; VERGANI, 1999). O efeito citopático da replicação do HIV nos linfócitos CD4 podem ser decorrentes da formação de sincícios (as membranas plasmáticas das células T infectadas pelo HIV, e que expressam gp 120 na sua superfície, fundem-se com as células TCD4+ não infectadas, induzindo à formação de células gigantes multinucleares), (ABBAS et al., 2000), entre as células que expressam receptores CD4, sendo este um dos mecanismos responsáveis pela diminuição dessa população celular (BLANCO et al., 2001). Outros efeitos como os indiretos levando à depleção dos linfócitos TCD4+, como a lise das células infectadas devido à resposta imune ao HIV, inibição da maturação dos linfócitos T CD4 no timo (ABBAS et al., 2000), e apoptose também foram descritos (BELL; DOCKRELL, 2003).

As células CD4+ Th1 migram principalmente dos tecidos linfóides secundários aos locais de infecção e a sua ativação por macrófagos infectados resulta na síntese de citocinas como IL-2 (responsável pela proliferação e a diferenciação das células T), TNF- α , IFN- γ (moléculas responsáveis pela ativação de macrófagos). As células T efetoras podem mediar uma variedade de funções, como a citólise das células infectadas pelas células T CD8+ citotóxicas e a ativação de macrófagos conduzindo a imunidade mediada por células (JANEWAY et al., 2002). Portanto, as citocinas

sintetizadas por células Th1 ativam células envolvidas na imunidade celular como TCD8+, natural Killer e macrófagos. A função das células TCD8 citotóxicas é lisar as células que foram dominadas pela infecção intracelular. Além de sua ação citotóxica também contribuem para a resposta imune, secretando citocinas como interferon- γ , inibindo a replicação viral (BENJAMINI et al., 2002). Por outro lado, os linfócitos CD4+ Th2 sintetizam citocinas como, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, cooperando com a resposta imune humoral através da proliferação das células B e na produção de anticorpos (PARHAM, 2001).

A especificidade da resposta imune pelos linfócitos T CD4+ ocorre através da expansão seletiva dos clones, capazes de reconhecer determinantes antigênicos e se diferenciar em células efetoras (LÓPEZ-MORENO, 2002).

A presença de citocinas no momento da estimulação das células T é um dos fatores principais que determinam se a diferenciação ocorre em direção do tipo T_H1 ou T_H2. O predomínio de células Th1 e suas citocinas são evidenciados durante a respostas aos vírus e bactérias, já a presença de células Th2 e suas citocinas estão relacionadas às respostas a parasitas e alérgicas (BENJAMINI, et al., 2002).

2.5.2 Citometria de fluxo

O monitoramento das células T CD4+ vem sendo utilizada como um parâmetro laboratorial preditivo do prognóstico das doenças causadas pelo HIV, e também como indicador da magnitude do risco para as principais infecções oportunistas, principalmente em pacientes com doença sintomática. Sua avaliação seriada vem sendo utilizada tanto na indicação como na avaliação da necessidade de modificação dos esquemas anti-retrovirais, apresentando uma boa correlação com a resposta ao tratamento (BRASIL, 2002). As contagens de células CD4 é o teste padrão para estagiar a doença, formular o diagnóstico diferencial e para tomar decisões no que concerne ao tratamento profilático de patógenos. Este teste complementa o exame de carga viral, e juntos prevêm de modo independente a evolução clínica e a sobrevida do paciente (BARTLETT; GALLANT, 2000).

Uma metodologia que vem sendo atualmente empregada para esta finalidade é a citometria de fluxo (PARHAM, 2001). A contagem de subpopulações celulares

consiste na identificação de seus antígenos de superfície através da marcação com corantes fluorescentes ligados aos anticorpos específicos para proteínas da superfície celular (DEEMS et al., 1994).

2.5.3 Parasitas intestinais e o HIV

Várias doenças infecto-parasitárias endêmicas no Brasil são de interesse no contexto da infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) /AIDS, devido ao importante papel da imunidade celular na história natural dessas doenças (VITÓRIA, 2002).

Contudo, a prevalência de parasitas específicos em pacientes com HIV, pode variar de país e até mesmo em diferentes regiões de um mesmo país, influenciados pela alta diversidade geográfica, clima e características socioeconômicas (FEITOSA et al., 2001).

Entre os enteroparasitas estão os protozoários oportunistas intracelulares, *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli*, *Encephalitozoon* e *Enterocytozoon*, que são causadores de diarreias crônicas debilitantes (PUNPOOWONG et al., 1998).

Outras parasitoses intestinais como, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Schistosoma mansoni* e o *Strongyloides stercoralis*, também podem contribuir para uma maior morbidade em pacientes imunocomprometidos, principalmente naqueles que residem em áreas endêmicas (LINDO et al., 1998).

Embora tenham sido relatados alguns casos de estrogiloidíase e esquistossomose disseminadas em pacientes imunossuprimidos pelo HIV, não existem evidências epidemiológicas consistentes de um aumento da prevalência dessas formas clínicas em pacientes com AIDS (VITÓRIA, 2002).

A estrogiloidíase extra-intestinal, foi considerada agente de infecção oportunista pelo Centers for Disease Control (CDC), em 1986, na classificação de doenças relacionadas à AIDS (HARCOURT-WEBSTER et al., 1991; DIAS et al., 1992). Contudo devido à baixa incidência do número de casos descritos quando comparado às outras infecções, esta parasitose perdeu seu caráter oportunista (SARANGARAJAN et al., 1997b). Cimerman e Cimerman, (2001), acreditam que um

dos fatores que poderiam subestimar esta parasitose, seria a não realização de necrópsias de forma sistematizada em pacientes com AIDS, e que o diagnóstico da forma disseminada as vezes não é realizado.

As manifestações gastrointestinais nos pacientes com HIV são descritas na literatura, sendo que a diarréia persistente, com perda de peso e febre parecem ocorrer com mais freqüência nos casos definidos como AIDS (HEYWORTH, 1996). Estudos com pacientes africanos infectados com HIV, mostraram que 47% destes apresentaram patógenos entéricos, sendo que os parasitas mais freqüentemente encontrados foram: *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Schistosoma mansoni*, *Cryptosporidium* spp, *Isospora belli*, *Strongyloides stercoralis* e *Trichuris trichiura* (COLEBUNDERS et al., 1987).

Levi et al., (1997) enfatizaram a importância de incluir a estrogiloidíase no diagnóstico diferencial de enfermidades febris em pacientes com AIDS, especialmente quando apresentarem sintomas pulmonares e gastrointestinais.

Um estudo realizado na Tailândia com pacientes infectados pelo HIV mostrou que 33 a 45% desses indivíduos apresentavam sintomas diarréicos, e os parasitas encontrados foram os protozoários *Microsporidium* (27,27%) seguido do *Cryptosporidium* spp e *Giardia lamblia* (9,09%), e *Isospora belli* (4,54%). O helminto com maior prevalência foi *S. stercoralis* (13,64%) seguido de *Opisthorchis viverrini* (4,55%) (PUNPOOWONG et al., 1998).

Outras pesquisas para avaliar a associação entre HIV e enteroparasitas revelaram a presença de protozoários intestinais como *Isospora belli*, *Cryptosporidium* spp *Cyclospora* sp e *Giardia lamblia*, e o helminto *S. stercoralis* (CIMERMAN et al., 1999; GARCÍA-ZAPATA et al., 2000). Na Bahia, pesquisas similares foram realizadas, sendo que a prevalência de *S. stercoralis* e *Giardia lamblia* foi superior nos indivíduos infectados pelo HIV em relação aos pacientes HIV negativos (FEITOSA et al., 2001).

Segundo Waywa et al., (2001) protozoários como *Criptosporidium parvum*, *Ciclospora* sp e microsporídios, são agentes etiológicos de diarréias em pacientes com AIDS, sendo necessário, para detecção desses parasitas, colorações específicas como a de Kinyoun-modificada, tricrômica modificada, Gram-chomotrope. A Imunofluorescência indireta e a amplificação gênica (PCR) também têm sido utilizadas (GARCÍA-ZAPATA et al., 2000).

2.6 Epidemiologia do *S. stercoralis*

No Brasil os dados com relação à estrogiloidíase são variáveis dependendo da região, sendo que essas variações ocorrem em função da idade da população, diferenças geográficas e socioeconômicas. Há relatos da prevalência entre 15-82%, com uma taxa média de 20%, sendo, portanto, uma doença de impacto na saúde pública em algumas regiões. As maiores taxas foram observadas nos Estados de Minas Gerais, do Amapá, de Goiás e de Rondônia (VERONESI;FOCACCIA, 1997). Estudos conduzidos em Uberlândia (MG), Maceió e Florianópolis, demonstraram respectivamente taxas de 13%, 11,3% e 6,5% de estrogiloidíase (KOBAYASHI et al., 1996; MACHADO; COSTA CRUZ, 1998; CANTOS et al., 2002).

Em outros países da América do Sul as taxas de *S. stercoralis* encontradas foram: Colômbia em torno de 16%, Venezuela, 4,4%, Bolívia, 1-3%. Na América Central, Costa Rica apresentou índices de 1,1 a 16,5% e outros países tais como Porto Rico, Honduras e Panamá apresentaram alta endemicidade (VERONESI; FOCACCIA, 1997). Na América do Norte a estrogiloidíase foi endêmica no México e no sudeste dos Estados Unidos (Kentucky e Tennessee) (SIDDIQUI; BERK, 2001).

Na Europa há relatos de estrogiloidíase no norte da Inglaterra, França, Espanha, Grécia e na Iugoslávia. Nos países africanos há relatos de prevalência de 26% no Congo, de até 46% na república Centro-Africana e de 0,2-11,7% na Nigéria (WEHNER;KIRSCH, 1997). Embora o *S. fuelleborni* seja encontrado na África, e em países como a República Centro-Africana, como Camarões e Etiópia, o *S. Stercoralis* tem sido encontrado mais freqüentemente nestas regiões (VERONESI; FOCACCIA, 1997).

2.7 Métodos parasitológicos de fezes

Os métodos parasitológicos empregados na rotina de um laboratório clínico visam aumentar o número de cistos, ovos ou larvas na sua preparação. Entre os procedimentos de rotina estão as técnicas de concentração que objetivam a

eliminação da maioria dos detritos fecais, apresentar os organismos em um estado inalterado, facilitando a identificação de estruturas parasitárias. Essas técnicas são indicadas para separar os cistos e oocistos de protozoários e ovos de helmintos do excesso de detritos fecais através de diferenças específicas de densidade (DE CARLI, 2001, p. 49).

Entre as técnicas de concentração encontra-se a de Ritchie (1948), que baseia-se na centrífugo-sedimentação e que tem como base o formol-éter. É utilizada para pesquisa de ovos e larvas de helmintos, e cistos de protozoários (FORBES et al., 1998).

A técnica de centrífugo-flutuação, como a de Faust, fundamenta-se no princípio da diferença de massas específicas entre os ovos de helmintos, cistos de protozoários e o diluente fecal (sulfato de zinco), para que esses organismos flutuem na superfície dos reagentes com densidade específica. As principais vantagens desta técnica é a formação de uma membrana na superfície do tubo com poucos detritos fecais. Seu objetivo é a recuperação de ovos leves e cistos de protozoários (DE CARLI, 2001, p. 50).

Outra técnica de flutuação descrita é a de Willis, que fundamenta-se na propriedade que apresentam certos ovos de helmintos de flutuarem na superfície de uma solução saturada de cloreto de sódio, e de aderirem ao vidro. É indicada para pesquisa de ovos leves de helmintos (CIMERMAN; CIMERMAN, 2001).

O método de concentração utilizando a técnica da sedimentação por gravidade, descrita por Hoffman, Pons e Janer em 1934, é utilizado para a pesquisa de ovos, larvas e cistos, sendo indicado sobretudo na pesquisa de ovos pesados de helmintos (NEVES, 2002). Fundamenta-se na sedimentação espontânea desses elementos em água, sendo este um dos métodos mais utilizados em parasitologia devido às suas vantagens com relação aos custos, praticidade e eficácia.

Na pesquisa de larvas de helmintos um dos métodos mais utilizados e descritos na literatura é o de Baerman-Moraes e Rugai, que fundamenta-se no termotropismo e hidrotropismo positivo das larvas de nematóides (REY, 1991). O que diferencia estas duas metodologias são as técnicas utilizadas. Os cuidados para sua execução seriam a obtenção de fezes recentes, e sem conservador.

A cultura de fezes para o isolamento de larvas faz-se necessário quando esses organismos estão em pequeno número e não são detectados pelas técnicas de concentração, sendo indicada para a detecção de infecções por ancilostomídeos,

S. stercoralis e do *Trichostrongylus* (DE CARLI, 2001). Descrito por Harada- Mori, em 1955, este método baseia-se na identificação de larvas de nematóides que emergem de amostras fecais cultivadas no papel-filtro, de modo a permitir que uma corrente líquida ascendente percorra a tira de papel. Assim, por capilaridade, as larvas existentes nas fezes são estimuladas a migrarem para o fundo do tubo. Este método permite a observação das diversas fases das larvas de nematóides e estágios de vida livre (REY, 1991).

Uma metodologia mais recente, que utiliza a cultura em placa de vidro foi descrita por Arakaki, em 1988. Tem como princípio os rastros e sulcos deixados pelas larvas na superfície do agar, através da disseminação das colônias das bactérias aderidas ao corpo da larva. A superfície do agar pode ser lavada com formalina a 10% e assim é realizada a identificação das estruturas parasitárias, após o exame direto do sedimento (KOGA et al, 1990).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as diferentes técnicas empregadas para o diagnóstico de *Strongyloides stercoralis*, utilizando amostras fecais de indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana, atendidos no Hospital Dia da Secretaria Municipal de Saúde de Itajaí e indivíduos HIV-negativos, atendidos no Laboratório Escola de Análises Clínicas da UNIVALI.

3.2 Objetivos específicos

Comparar a sensibilidade entre os métodos parasitológicos utilizados: Hoffman, Pons e Janer, Ritchie, Baermann-Moraes, Harada-Mori e Cultura em Placa, na identificação de parasitas intestinais nos dois grupos estudados.

Comparar o método de Cultura em placa com diferentes técnicas empregadas para o diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* com relação à sua eficácia.

Avaliar a frequência de estrogiloidíase nos grupos de indivíduos, HIV - positivos e negativos.

Correlacionar a imunidade humoral dos pacientes HIV positivos com a estrogiloidíase, avaliando a contagem de Linfócitos T CD4+.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Participaram deste trabalho dois grupos de pacientes, de ambos os sexos, e com idade entre 18 e 82 anos, no período compreendido entre setembro de 2001 a junho de 2002. O primeiro grupo foi formado por 211 indivíduos portadores do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), cujo diagnóstico foi realizado pelos testes de pesquisa de anticorpos anti-HIV 1-2, Imunofluorescência Indireta e pela técnica de Western-blot segundo o fluxograma do Ministério da Saúde. Esses indivíduos foram atendidos no Hospital Dia do município de Itajaí SC, e após orientação com relação à coleta de fezes e sangue para as contagens de células T CD4, pela equipe médica e de enfermagem, foram encaminhados ao Laboratório Municipal de Análises Clínicas de Itajaí SC, onde assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Para a determinação das contagens de linfócitos T CD4 no grupo HIV, um total de 185 indivíduos coletaram sangue total através de punção (4,5ml) a vácuo em tubos contendo anticoagulante ácido etilenodiamino-tetracético. (EDTA) As amostras assim coletadas foram encaminhadas ao setor de Hematologia do Laboratório Municipal de Itajaí SC.

O segundo grupo foi formado por 213 indivíduos HIV-negativos, os quais foram encaminhados ao Laboratório Escola da UNIVALI- SC, para receberem orientações com relação à coleta de material fecal. As fezes foram encaminhadas ao setor de parasitologia onde os exames parasitológicos desta pesquisa foram realizados.

Este projeto, que envolve pesquisa com seres humanos, teve aprovação dos comitês de ética da Universidade Federal de Santa Catarina e da UNIVALI conforme documentos em anexo.

4.2 Métodos

A metodologia empregada para a realização dos exames nas amostras fecais, em ambos os grupos foram os métodos de Hoffman, Pons e Janer, Ritchie, Baermann-Moraes, Harada-Mori e cultura em placa. Os procedimentos com relação à realização das técnicas parasitológicas, foram realizados observando as recomendações de biossegurança.

4.2.1 Método de Ritchie

Técnica: As fezes coletadas de ambos os grupos, foram misturadas com água na proporção de 1 para 10, filtradas para tubo de centrifugação de 15 mL através de protogaze e centrifugadas a 340 x g por 1 minuto. Decantou-se o sobrenadante e ao sedimento adicionou-se 4mL da solução de formol a 10%, deixando em repouso por 5-10 minutos para fixação. Em seguida adicionou-se 2mL de éter sulfúrico, sendo que o tubo foi novamente fechado com rolha e agitado vigorosamente, e centrifugando a uma RCF de 340 x g, durante 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e ao sedimento foi adicionado 1 gota de lugol. (figura 8) Este sedimento foi colocado sobre a lâmina, coberto com lamínula e, em seguida, examinado ao microscópio marca Olympus, com aumento de 10 e 40x (EURICO; LITTON, 1999).

4.2.2 Método de Hoffman, Pons e Janer

Técnica: Cerca de 2 a 4g de fezes foram dissolvidas em 20mL de água e filtradas em protogaze para um cálice de sedimentação. O volume do cálice foi completado com água até próximo à borda e deixado em repouso por 2 horas. Em seguida com uma pipeta fechada na parte superior, retirou-se do fundo do cálice uma pequena amostra do sedimento. (Figura 8) Uma ou duas gotas de sedimento foram colocados sobre uma lâmina, coradas com lugol, cobertas com uma lamínula e observadas ao microscópio com aumento de 10 e 40x (EURICO; LITTON, 1999).



FIGURA 8: Método de Ritchie e Hoffman. Foto original do autor.

4.2.3 Método de Baermann -Moraes

Técnica: Foram colocadas cerca de 5- 10 g de fezes sobre a protogaze em uma peneira em um suporte adequado e sob um funil o qual foi adaptado a um tubo de borracha com uma pinça Mohr. Em seguida, foi colocada água no funil à temperatura de 42 a 45°C, até que a sua superfície entrasse em contato com as fezes na parte inferior da peneira, ficando as mesmas parcialmente submersas. Após 60 minutos abriu-se a pinça e deixou-se escorrer uma parte do líquido do funil (5 a 7 mL) para um tubo cônico e centrifugou-se por 1 minuto a 340 x g. (Figura 9) Em seguida, examinou-se o sedimento ao microscópio com aumento de 10x. As amostras positivas foram coradas com 1 ou 2 gotas de lugol e o sedimento examinado em uma lâmina coberta por lamínula ao microscópio com aumento de 40x (REY, 1991).



FIGURA 9: Método de Baermann-Moraes . Foto: original do autor

4.2.4 Método de Harada-Mori

Técnica: Cerca de 1 a 2g de fezes foram espalhadas com um palito estéril sobre uma faixa de papel filtro de 2 x 15 cm, a qual foi dobrada longitudinalmente ao meio deixando livres as duas extremidades. Adicionou-se 3 a 4 mL de água destilada em um tubo de ensaio de 2 x 15 cm, no qual a faixa de papel filtro foi mergulhada até o nível da água (aproximadamente 1 cm abaixo da amostra fecal). O tubo foi fechado com rolha, e deixado em temperatura ambiente (23-29°C). (Figura 10) Após um período de 5 e 7 dias, o líquido foi decantado para um vidro relógio, e examinado ao microscópio com a objetiva de 10x. As larvas quando presentes foram coradas com lugol e examinadas ao microscópio com aumento de 10x e 40x (REY, 1991).

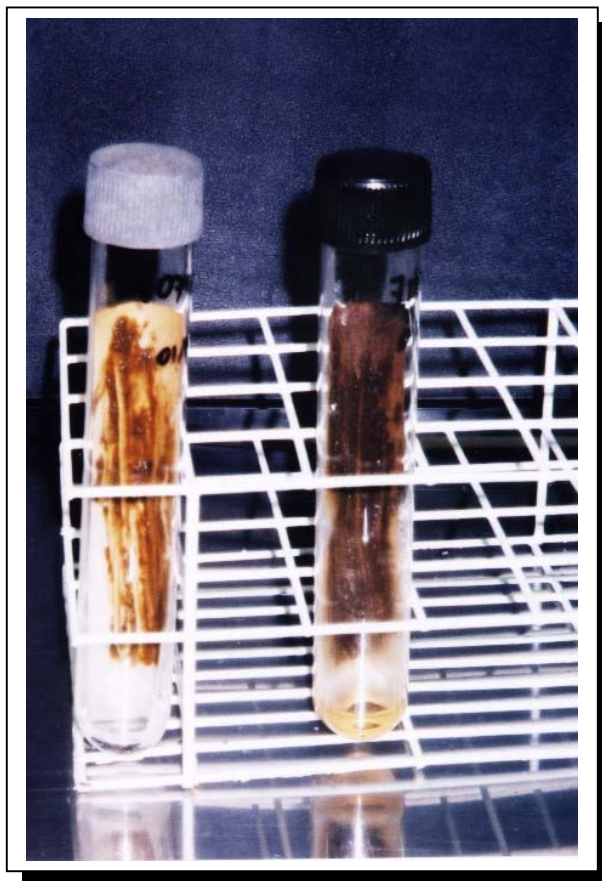


FIGURA 10: Método Harada-Mori. Foto: original do autor

4.2.5 Método de cultura em placa

Técnica: Colocou-se aproximadamente 2g de fezes frescas no centro da placa de agar bacteriológico com 25-30mL de meio. Esta placa foi selada com fita adesiva à temperatura ambiente por 48 horas, conforme recomendado por Koga et al., (1991). Depois desse período, as placas foram examinadas observando-se os possíveis rastros deixados pela migração da larva na superfície do agar (Figura 11). A seguir, tanto para as amostras positivas como negativas, foi adicionado aproximadamente 10 mL formalina a 10% na superfície do agar, esperando 5 minutos. O excesso de formalina foi decantado em um tubo cônico e centrifugado por 2 minutos a 340 x g. O sedimento foi examinado, utilizando microscópio com objetiva de 10 e 40x (ARAKAKI et al., 1990; PANOSIAN et al., 1986).



FIGURA 11: Método cultura em placa. Foto: original do autor

4.2.6 Contagens de linfócitos T CD4/CD8

A coleta para este exame foi realizada através de uma amostra de sangue total coletado a vácuo com anticoagulante K_3EDTA . Após uma leve homogeneização $50\mu L$ de sangue foram adicionados aos tubos de reação que continham anticorpos monoclonais (Figura 13) Becton Dickinson®, anti CD3 e CD4 e outro contendo anticorpos monoclonais anti CD3 e CD8. Após 60 minutos foi adicionada solução fixadora (5% de paraformaldeído em tampão fosfato) e a contagem das populações de linfócitos foi realizada no citômetro de fluxo (Figura 12) Becton Dickison FACSCount®. As células emitiram fluorescência quando excitadas pelo feixe de laser e a luz emitida foi detectada e processada pelo equipamento. Os resultados foram expressos em número absoluto de linfócitos T auxiliares (CD3+/CD4+) e de linfócitos T citotóxicos (CD3+/CD8+) (DEEMS et al., 1994).



FIGURA 12: Citômetro de fluxo

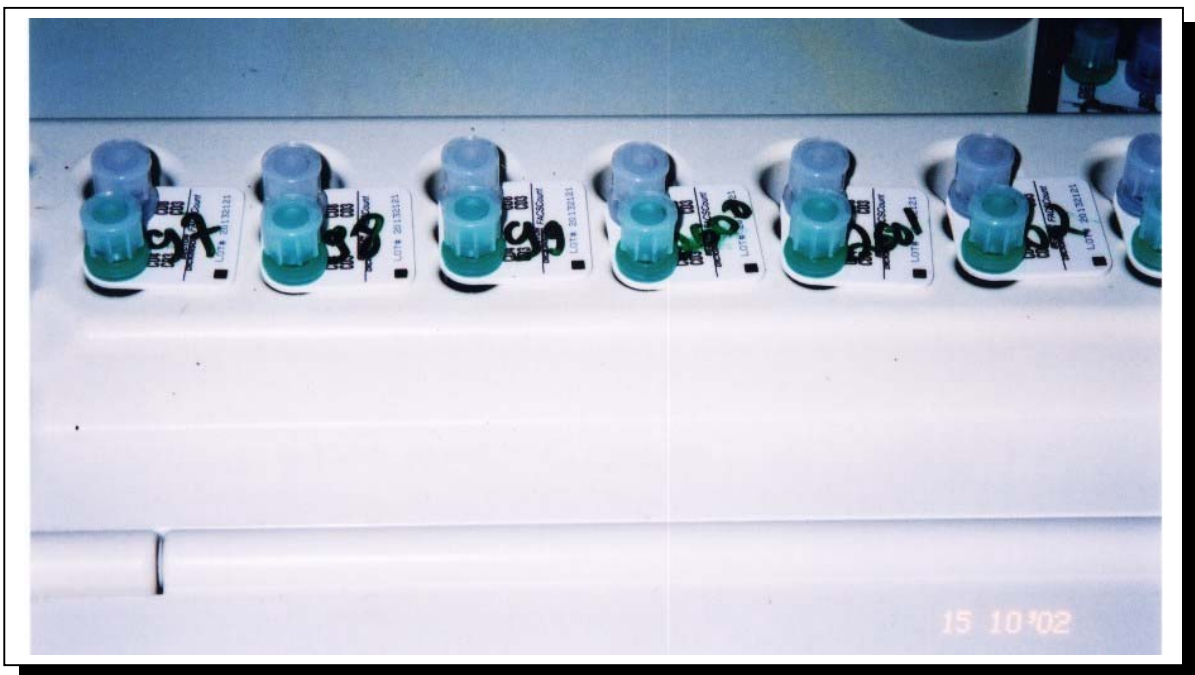


FIGURA 13: Tubos de reações contendo anticorpos monoclonais

4.2.7 Análise estatística

Realizou-se uma análise descritiva dos dados utilizando distribuição de frequência e testes de associação: Qui-quadrado, teste exato de Fisher, teste de proporção simples. Calculou-se ainda a odds ratio na análise comparativa de estrogiloidíase em pacientes HIV e ambulatoriais. O nível de significância aceito foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

Foram analisadas 424 amostras de fezes obtidas de 213 indivíduos atendidos no ambulatório da Universidade do Vale do Itajaí-SC, e 211 indivíduos portadores do HIV provenientes do Hospital Dia da Secretaria Municipal de Saúde de Itajaí-SC. Os resultados deste trabalho estão expostos nas tabelas abaixo:

TABELA 1: Distribuição dos indivíduos HIV positivos e HIV negativos, segundo faixa etária. Itajaí, set/2001 a junho/2002. (n=424)

Faixa etária	HIV positivos		HIV negativos	
	Nº	%	Nº	%
18 – 40 anos	148	70,1	144	67,6
> 40 anos	63	29,9	69	32,4
Total	211	100	213	100

Os pacientes em questão foram avaliados por faixa etária conforme a tabela 1. Nota-se que o grupo HIV positivo com 70,1% e HIV negativo 67,6%, na sua maioria foi constituído por indivíduos com faixa etária entre 18-40 anos.

TABELA 2: Distribuição dos indivíduos HIV positivos e HIV negativos segundo sexo. Itajaí, set/2001 a junho/2002. (n=424)

Sexo	HIV positivos		HIV negativos	
	Nº	%	Nº	%
Masculino	125	59,2	77	36,2
Feminino	86	40,8	136	63,8
Total	211	100	213	100

A tabela 2 considera a população analisada em relação ao sexo. No grupo HIV positivo 59,2% dos pacientes foram do sexo masculino e 40,8% foram do sexo feminino. No grupo HIV negativo ocorreu um predomínio maior do sexo feminino com 63,8%, em relação ao masculino 36,2%.

TABELA 3: Percentual de parasitas intestinais, nos indivíduos HIV positivos (n=211) e negativos (n=213). Itajaí, set/2001 a junho/2002.

Grau de parasitismo por paciente	HIV positivos		HIV negativos	
	Nº	%	Nº	%
Monoparasitado	27	12,8	39	18,4
Biparasitado	5	2,4	5	2,3
Poliparasitado	0	0	5	2,3
Total	32	15,2	49	23

A tabela 3 mostra que os indivíduos, de ambos os grupos são, na sua maioria, monoparasitados, seguidos dos biparasitados, sendo que nenhum indivíduo apresentou poliparasitismo no grupo HIV positivo.

TABELA 4: Frequência de protozoários e helmintos intestinais em indivíduos HIV positivos (n=211) e negativos (n = 213). Itajaí, set/2001 a junho/2002 (n=424)

	HIV positivo		HIV negativo		Total		Valor de p
	f	%	f	%	f	%	
<u>Helmintos</u>							
<i>S. stercoralis</i>	21	10	12	5,6	33	7,8	0,097 ^a
<i>A. lumbricoides</i>	5	2,4	11	5,2	16	3,8	0,131 ^a
<i>T. trichiuria</i>	1	0,5	3	1,4	4	0,9	0,623 ^b
<i>Ancilostomídeos</i>	0	0	3	1,4	3	0,7	0,248 ^b
<i>Trichostrongylus</i>	0	0	2	0,9	2	0,9	0,498 ^b
<i>Taenia spp</i>	1	0,5	0	0	1	0,2	0,498 ^b
<u>Protozoários</u>							
<i>Endolimax nana</i>	4	1,8	19	8,9	23	5,4	0,001 ^{b**}
<i>Giardia lamblia</i>	1	0,5	4	1,9	5	1,2	0,372 ^b
<i>Entamoeba coli</i>	2	0,9	10	4,7	12	2,8	0,036 ^{b*}
<i>Isospora belli</i>	2	0,9	0	0	2	0,5	0,247 ^b

a= teste Qui quadrado; b=teste exato de Fisher

* p < 0,05

** p < 0,001

A tabela 4 demonstra a distribuição dos enteroparasitas nos dois grupos estudados, sendo que os parasitas em destaque nos grupos foram: *S. stercoralis*, *A. lumbricoides*, *E. nana*. No grupo HIV positivo, o parasita mais freqüentemente encontrado foi o *S. stercoralis* 10%, seguido pelo *Ascaris lumbricoides* 2,4%. E no grupo HIV negativo os de maior prevalência foram *S. stercoralis* 5,6%, *Ascaris lumbricoides* 5,2%, *Endolimax nana* 8,9% e *Entamoeba coli* 4,7%. As diferentes prevalências de parasitas intestinais entre os dois grupos, foram estatisticamente

significativas apenas no que se refere a *Endolimax nana* ($p < 0,001$) e *Entamoeba coli* ($p < 0,05$), com maior predomínio no grupo ambulatorial.

TABELA 5: Frequência de larvas de *Strongyloides stercoralis* entre as parasitoses na população infectada do grupo HIV positivo e negativo. Itajaí, set/2001 a junho/2002.

<i>Strongyloides stercoralis</i>	HIV positivo		HIV negativo		OR	IC95%
	N	%	N	%		
Sim	21	63,6	12	36,4	5,687	2,303;14,043
Não	16	23,5	52	76,5	1	

OR= odds ratio; IC= intervalo de confiança

Uma análise comparativa da frequência de estrogiloidíase entre a população parasitada, evidenciou um predomínio deste helminto no grupo de indivíduos com HIV, conforme informa a tabela 5. A população infectada pelo HIV apresentou cinco vezes mais propensão de ser infectada por *S. stercoralis*, em relação às outras parasitoses, quando comparado ao grupo de indivíduos HIV negativo parasitados.

TABELA 6: Comparação das análises parasitológicas na identificação dos enteroparasitas, utilizando diferentes metodologias. Itajaí, set/2001 a junho/2002 (n=424)

Parasitas	Hoffman		Ritchie		Baermann		Cultura em placa		Harada-Mori		Total
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
<u>Helmintos</u>											
<i>S. stercoralis</i>	14	42,4	16	48,5	16	48,5	23	69,7	8	24,0	33
<i>A. lumbricoides</i>	15	93,8	12	75	--	--	--	--	--	--	16
<i>Trichuris trichiura</i>	2	50	4	100	--	--	--	--	--	--	4
<i>Ancilostomídeos</i>	1	33,3	2	66,7	--	--	1	33,3	2	66,7	3
<i>Trichostrongylus sp</i>	2	100	--	--	--	--	--	--	--	--	2
<i>Taenia sp</i>	1	100	1	100	--	--	--	--	--	--	1
<u>Protozoários</u>											
<i>Endolimax nana</i>	12	52,2	21	95,0	--	--	--	--	--	--	23
<i>Giardia lamblia</i>	4	80	5	100	--	--	--	--	--	--	5
<i>Entamoeba coli</i>	11	91,7	11	91,7	--	--	--	--	--	--	12
<i>Isospora belli</i>	1	50	2	100	--	--	--	--	--	--	2

A tabela 6 compara o resultado das análises parasitológicas utilizando diferentes metodologias. Nota-se que de um total de 424 amostras de fezes analisadas, 33 foram positivas para *S. stercoralis*, sendo o método Cultura em Placa o mais eficaz no diagnóstico de *S. stercoralis*, detectando 23 amostras positivas 69,7%, seguido pelo método de Baermann e Ritchie, que detectaram 16 (48,5%), Hoffman 14 (42,4%) e Harada-Mori (8 (24,0%). A tabela evidencia também a eficácia dos métodos de Hoffman e Ritchie na detecção de outros enteroparasitas. O método de Harada-Mori detectou 66,7% dos casos positivos para larvas de ancilostomídeos. No entanto, tais dados devem ser analisados com cautela frente ao baixo número de casos positivos (n=3) para esta parasitose.

TABELA 7: Comparação da eficácia do método cultura em placa na identificação de larvas de *Strongyloides stercoralis*, em relação aos demais métodos utilizados com indivíduos HIV positivo e negativo, através do teste de proporção simples. Itajaí, set/2001 a junho/2002 (n=33)

Métodos	N	Proporção observada	Valor de p
Cultura	23	0,697	0,012*
Hoffman	14	0,424	
Cultura	23	0,697	0,0398*
Ritchie	16	0,484	
Cultura	23	0,697	0,0398*
Baermann	16	0,484	
Cultura	23	0,697	0,001**
Harada	8	0,247	

Valor estatístico significativo: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

A tabela 7 que compara o método cultura em placa com as demais metodologias empregadas na pesquisa, demonstrou ser esta estatisticamente superior na detecção de larvas de *S. stercoralis* em relação ao método de Hoffman ($p < 0,012$)*; em relação ao Ritchie e ao Baermann ($p < 0,03$)*; e em relação ao Harada-Mori. ($p < 0,001$)**

TABELA 8: Ocorrência de Estrongiloidíase segundo as contagens de células TCD4⁺ no grupo de indivíduos HIV positivo. Itajaí, set/2001 a junho/2002 (n=185).

Presença de <i>S. stercoralis</i>	Nº de indivíduos	> 500/mm ³		499-200/mm ³		< 200/mm ³		Valor p
		nº	%	nº	%	nº	%	
Ausente	164	37	22,6	92	56,1	35	21,3	0,029
Presente	21	4	19,0	6	28,6	11	52,4	
Total	185	41	22,2	98	53,0	46	24,9	

Valor de p (teste Qui-quadrado de tendência)

A tabela 8 evidencia uma significativa tendência de aumento da ocorrência de *S. stercoralis* à medida que diminuem as contagens de células T CD4⁺, sendo que do total de indivíduos com estrongiloidíase 11 (52,4%), apresentaram contagens de linfócitos < 200 células/mm³ (p<0,029). Observa-se ainda nesta tabela, que apenas 22,2% da população HIV apresentou contagens de linfócitos > 500 células/mm³, e que 53,0% encontram-se com contagens entre 499-200 células/mm³.

6 DISCUSSÃO

A estrogiloidíase é uma doença parasitária endêmica dos trópicos e subtropicais, afetando 30 milhões de pessoas em 70 países (SIDDIQUI; BERK, 2001). O Brasil, juntamente com a Tailândia, são os países que têm a maior taxa de prevalência documentada (FIGUEIREDO et al., 2000).

Neste trabalho as análises parasitológicas foram realizadas com dois grupos distintos de indivíduos: HIV negativos e HIV positivos. O primeiro grupo foi importante por permitir que se fizesse considerações quanto às diversas técnicas empregadas no diagnóstico das enteroparasitoses, e também poder comparar a frequência de *S. stercoralis* nos dois grupos em questão.

O grupo HIV positivo foi escolhido porque segundo relatos da literatura, em indivíduos imunocomprometidos a ocorrência de *S. stercoralis* é mais expressiva (SARANGARAJAN et al., 1997a; PAULA et al., 2000). De fato, este grupo forneceu melhor suporte, permitindo fazer considerações quanto às diferentes metodologias empregadas na busca de um diagnóstico mais eficaz para esta parasitose. Outro motivo de se trabalhar com este grupo de pacientes, deve-se ao fato de que a cidade de Itajaí S.C., onde os dados foram obtidos, ser um dos municípios com os maiores números de casos notificados por ano, com um total aproximado de 78 novos casos para 100.000 habitantes (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2002).

As tabelas 1 e 2 mostram o perfil dos indivíduos analisados neste trabalho. Na tabela 1, nota-se que, em relação à faixa etária, a diversidade dos grupos foi relativamente pequena, sendo que houve um predomínio maior de indivíduos de 18 a 40 com 70,1% no grupo HIV positivo e 67,6% no grupo HIV negativo.

Em relação ao sexo, observa-se na tabela 2 que no grupo HIV positivo, a população do sexo masculino foi superior (59,2%) em relação às mulheres (40,8%). Esses dados sugerem que a tendência de crescimento de mulheres infectadas com HIV vem sendo mais rápida, tanto para o Brasil quanto para algumas regiões onde a epidemia prevalece. Os indicadores epidemiológicos mostram uma redução da

proporção entre os sexos, que se apresentava 3:1 entre 1993 e 1996. Em 1997 a relação passou a ser de 2:1, sendo que no grupo etário de 15-19 anos, a partir de 1996 a razão é de 1:1 (VERMELHO et al., 2002).

A tabela 3 demonstra o percentual de parasitismo nos grupos analisados, sendo que nos indivíduos HIV positivos obteve-se 16,6%, e no grupo HIV negativo 21,6%. Em ambos os grupos o monoparasitismo foi prevalente. Estes dados estão de acordo com os trabalhos de Cimerman et al., (1999) e Escobedo e Nuñez (1999), os quais demonstraram também a prevalência do monoparasitismo em pacientes HIV positivos e negativos. Cantos et al., (1995), verificaram a frequência das parasitoses no município de Florianópolis, observaram que 24,6% dos pacientes estavam parasitados e destes o monoparasitismo também foi prevalente.

A distribuição dos enteroparasitas foi mostrada conforme tabela 4, sendo que os parasitas *S. stercoralis*, *A. lumbricoides*, *E. nana*, foram encontrados com mais frequência nos dois grupos avaliados. No grupo HIV positivo, o helminto mais freqüente foi o *S. stercoralis* (10%), seguido do *A. lumbricoides* (2,4%), e no grupo HIV negativo a frequência destes helmintos também foi superior aos demais, contudo as diferentes prevalências de enteroparasitas entre os grupos foram estatisticamente significativas apenas para os protozoários *E. nana* ($p < 0,001$), e *E. coli* ($p < 0,05$), sendo estes considerados comensais.

Neste trabalho nota-se que o *S. stercoralis* foi o helminto mais freqüente tanto no grupo HIV positivo (10%) como no grupo HIV negativo (5,6%). Stuerchler definiu três regiões mundiais de acordo com a prevalência da infecção pelo *S. stercoralis* como esporádica (<1%), endêmica (1-5%) e hiperendêmica (>5%) (PIRES; DREYER, 1993). Considerando este tipo de classificação e os dados encontrados nesta pesquisa, observamos que a população de Itajaí é altamente exposta às infecções por *S. stercoralis*. Siddiqui e Berk, (2001) relataram a prevalência desta helmintíase em alguns países, sendo que no Brasil a prevalência relatada variou de 2,5 a 13%. Benetti e Bertuzzo (2002) relataram a incidência de parasitas em uma comunidade de Itajaí, tendo encontrado uma prevalência de *S. stercoralis* de 6%. Assim, mesmo sem considerar as técnicas empregadas para o diagnóstico deste nematoda, pode-se notar que esta parasitose é de grande relevância em nosso meio e que os dados encontrados nesta pesquisa estão em concordância com a literatura.

Observou-se que o *A. lumbricoides* foi um dos parasitas mais prevalentes, provavelmente devido à constituição dos seus ovos conferindo, por isso, grande resistência às condições adversas (NEVES, 2002). Quanto ao *T. trichiura*, a ocorrência deste helminto foi relativamente baixa em ambos grupos do estudo. Segundo Costa et al., (1999), estes parasitas demonstram ser prevalentes especialmente em crianças, onde as repercussões clínicas são mais significativas

Com relação à *Giardia lamblia*, sua frequência no grupo HIV-positivo foi de 0,5% e HIV-negativo de 1,9%, e portanto este protozoário não foi representativo nos grupos estudados. A baixa ocorrência deste protozoário talvez seja reflexo da população estudada, sendo a maioria adultos. Machado e Costa-Cruz et al., (1998) relataram que o decréscimo da taxa de giardíase com o aumento da idade, poderia ser explicado pela resistência imuno-mediada, adquirida em função de contatos sucessivos com o parasita. Consideraram também que a higiene pessoal é mais efetiva à medida que a criança cresce. Outro aspecto importante que poderia em parte justificar a baixa ocorrência desta protozoose, seria o fato de que três amostras, em dias alternados, deveriam ser coletadas por paciente a fim de se evitar o período negativo de eliminação desses cistos (DE CARLI, 2001).

Muitas pesquisas mostram a prevalência de alguns protozoários como *Isospora belli* no grupo HIV-positivos (FEITOSA et al., 2001; JOSHI et al., 2002). A tabela 4 mostra que este protozoário teve uma baixa ocorrência. Este achado pode ser justificado pela utilização de medicamentos profiláticos para algumas doenças em pacientes HIV, e que, portanto, estariam atuando também na prevenção deste protozoário.

Contudo, neste trabalho não foram realizadas técnicas específicas de coloração descritas na literatura como kinyoun, auramina-rodamina, tricrômica, gram-cromotrope (PUNPOOWONG et al., 1998; GARCIA-ZAPATA et al., 2000), utilizadas na pesquisa de coccídeos e protozoários oportunistas. O objetivo do trabalho foi dar ênfase ao diagnóstico da estrogiloidíase, mostrando a importância desta helmintíase dentro do contexto de saúde e principalmente para certos grupos especiais, como é o caso de pacientes com HIV.

Na tabela 5, a frequência de *S. stercoralis* foi verificada entre a população parasitada, nos dois grupos analisados, e observou-se que nos indivíduos HIV positivos ocorreu uma maior predisposição a este parasita em relação aos do grupo HIV-negativos parasitados. (odds ratio= 5,687) Este dado corrobora com os achados

de outros inquéritos, onde parece haver uma constante associação entre este parasita e a infecção pelo HIV (LINDO et al., 1998).

GARCÍA-ZAPATA et al., (2000), utilizando os métodos de sedimentação espontânea, formol-éter, Faust e da técnica de Ziehl-Nielsen modificada, reporta em pacientes imunossuprimidos atendidos no Hospital Universitário de Brasília, a seguinte ocorrência de enteroparasitas: *S. stercoralis*, (2,8%), *I. belli* (5,6%), *Cryptosporidium parvum* (4,2%) e *G. lamblia* (2,8%).

Fontanet et al., (2000), encontraram uma prevalência maior de *Entamoeba histolytica/Ent. dispar* em relação aos parasitas como *S. stercoralis*, ancilostomídeos, *A. lumbricoides*, *Taenia spp*, *T. trichiura* e *G. lamblia*, em pacientes HIV positivos residentes na Etiópia, utilizando os métodos direto, concentração em formalina-acetato de etila, e Baermann.

Feitosa et al., (2001) demonstraram também a ocorrência de parasitas em pacientes adultos HIV positivos, atendidos no Hospital da Universidade da Bahia, tendo encontrado 4,9% de *G. lamblia*, e 5,5% de *S. stercoralis*. As técnicas utilizadas nesta pesquisa foram o método de Hoffman, Faust, Baermann e coloração ácido-resistente.

Waywa et al., (2001), na Tailândia, demonstraram a presença de *Cryptosporidium sp* (19,2%), *Isospora* (3,8%) e *S. stercoralis* (8,0%), em indivíduos HIV que apresentavam quadros de diarreia. O diagnóstico foi realizado utilizando os métodos de Kinyoun e o de cultura em placa.

Joshi et al., (2002), utilizando técnicas específicas de coloração como Ziehl-Nielsen modificada, observaram na Índia, que em pacientes com AIDS e com quadros de diarreia aguda e crônica, houve a seguinte frequência de enteroparasitoses: *I. belli* :17%, *E. histolytica*: 14,9%, *Cryptosporidium*: 8,5%, *G. lamblia*: 4,3% e *S. stercoralis*: 5,3%.

Estes achados demonstram a necessidade de técnicas específicas para o diagnóstico dos diferentes parasitas causadores de enteropatia, reduzindo a morbidade e mortalidade destes pacientes por estes patógenos.

Assim, a maior ocorrência de *S. stercoralis* nos dois grupos analisados, deve-se também ao fato de que foram utilizadas 3 técnicas específicas para pesquisa de larvas de nematóides: os métodos de Baermann, Harada Mori e Cultura em Placa. A tabela 6 mostra que quando se utilizou somente o método de Hoffman, o *A. lumbricoides* foi o parasita de maior frequência. Observa-se também que quando se

analisam as diferentes metodologias empregadas, nota-se que a técnica de Ritchie detectou maior número de cistos como de *G. lamblia*, de *E. nana* e *I. belli*. De fato, este método é mais sensível para ovos leves de helmintos e cistos de protozoários (DE CARLI, 2001).

O trabalho em questão procura chamar a atenção para a importância da utilização de métodos direcionados para a pesquisa de larvas de *S. stercoralis*, mais eficazes no seu diagnóstico. Segundo Hernandez-Chavarria, (2001), esta parasitose pode estar sendo subestimada pois nem sempre apresenta-se com sintomatologia característica. Este autor considera que este helminto tem como agravante a pequena excreção das larvas pelo hospedeiro, necessitando então de técnicas sensíveis na sua detecção.

Assim, os métodos parasitológicos ainda são os de escolha na prática laboratorial no diagnóstico da estrogiloidíase, devido à facilidade no desenvolvimento das técnicas, economia e tempo, embora já existam testes imunológicos desenvolvidos para seu diagnóstico (JONGWUTIWES et al., 1999). Na perspectiva de Feltz et al., (1999), os exames sorológicos para estrogiloidíase são pouco sensíveis no diagnóstico recente da infecção, mas parece ser adequado na infecção assintomática e crônica.

O presente estudo verificou maior eficácia do método cultura em placa na identificação das larvas de *S. stercoralis*, sendo estes resultados semelhantes aos relatos da literatura. Segundo Hernandez-Chavarria, (2001), os métodos de Baermann e cultura em placa são os que apresentam maior eficiência diagnóstica para *S. stercoralis*. Outros autores consideram que a técnica coprodiagnóstica como cultura em placa é mais eficaz em comparação às técnicas tradicionalmente utilizadas no laboratório clínico (KOGA et al., 1990; UPARANUKRAW et al., 1999).

Nesta pesquisa, das 424 amostras de fezes analisadas (tabela 6), 33 (7,8%) foram positivas para *S. stercoralis*. Dos cinco métodos utilizados, a cultura em placa mostrou positividade para este helminto em 23 amostras (69,7%). Os métodos de Baermann e Ritchie detectaram este parasita em 16 amostras (48,5%), o de Hoffman em 14 amostras (42,4%) e de Harada-Mori em 8 amostras (24,0%). A comparação do método cultura em placa com as demais metodologias utilizadas nesta pesquisa, demonstrou ser este método estatisticamente superior na detecção de larvas de *S. stercoralis*, em relação a todos os demais, sendo esta diferença

maior em comparação ao método de Harada-Mori, devido à sua baixa eficácia no encontro deste helminto (tabela 7).

Em relação à literatura, nota-se que há muitos relatos que comparam diferentes técnicas no diagnóstico da estrogiloidíase. Alguns autores como Santos e Orides Filho, (1996); observaram que o método de Baermann foi 30% superior ao de Harada-Mori. Nesta pesquisa, no diagnóstico da estrogiloidíase, o método de Baermann, que é rotineiramente utilizado, foi superior aos demais, exceto em relação ao cultura em placa.

Relatos anteriores de Koga et al., (1991) e Sato et al., (1995) comparando o método de Harada ao da cultura em placa, foram similares aos apresentados nesta pesquisa, sendo a cultura em placa superior no diagnóstico de estrogiloidíase.

Arakaki et al., (1990) compararam o método de concentração formalina-éter ao da cultura em placa, e o número de casos positivos encontrados neste último foi 2 a 4 vezes superior ao primeiro. Kobayashi et al., (1996), confirmaram que o diagnóstico da estrogiloidíase foi mais eficiente quando se utilizou o método de cultura em placa, detectando 90% das amostras positivas, formalina-éter, 26,5% e Harada-Mori, 28,6%. Feltz et al., (1999) consideraram que o método de concentração com formol-éter não é adequado para a pesquisa de larvas pela baixa sensibilidade. Os resultados obtidos na presente pesquisa, confirmam estes dados obtendo em média 45% de eficácia para os métodos como Ritchie e Hoffman no encontro de larvas (tabela 6).

Segundo Kaminsky, (1993), quando a cultura em placa é utilizada juntamente com o método de Baermann, a eficiência no diagnóstico da estrogiloidíase é superior, mas os custos desta técnica seriam mais elevados. Por outro lado Hernández-Chavarría e Avendaño (2001), comparando o método de cultura em placa ao de Baermann, observou que resultados encontrados foram equivalentes na pesquisa de larvas de *S. stercoralis*. Portanto devido aos estudos não serem concordantes, há necessidade de maiores investigações comparando estas metodologias, uma vez que o método de Baermann é rotineiramente utilizado nos laboratórios clínicos.

O aumento na detecção de larvas pela cultura em placa deve-se também à possibilidade do encontro das formas de vida livre presentes no ciclo indireto (ATKINS et al., 1997). Estes achados foram confirmados também na presente

pesquisa pela presença da fêmea e macho de vida livre em algumas amostras (figuras 2 e 3).

O método de cultura em placa nesta pesquisa demonstrou ser mais sensível para *S. stercoralis* do que para ancilostomídeos, necessitando este último um período maior de incubação, para a expulsão das larvas. Em decorrência, a eficácia da cultura para detecção de larvas de ancilostomídeos foi de 33,3% em relação ao Harada-Mori, 66,7% (tabela 6).

Estes dados estão de acordo com Kobayashi et al., (1996), que observaram uma melhor eficácia do método Harada-Mori (30%) em relação ao da cultura em placa no encontro de ancilostomídeos. De fato, o método de Harada-Mori requer um tempo maior para análise, em torno de 5 dias, possibilitando a eclosão das larvas dos ovos de ancilostomídeos, o que aumenta sua ocorrência quando se utiliza este método.

Koga et al., (1991); Jongwutiwes et al., (1999), observaram que o tempo de incubação superior a 48 horas, aumenta a positividade para ancilostomídeos, não ocorrendo o mesmo para *S. stercoralis*, sendo possível a detecção de suas larvas nas primeiras 24 horas.

Em relação aos detalhes técnicos do método de cultura, nesta pesquisa a visualização dos rastros deixados pelas larvas na superfície do agar não foi padrão em todas as amostras. Estas observações reforçam as de outros autores que recomendam cuidados especiais no processo de análise, a exemplo de Arakaki et al. (1990) e Koga et al, (1991) que recomendam lavar o agar com formalina para melhorar a sensibilidade e caracterização das larvas.

Outros fatores segundo Sato et al., (1995) e Dreyer et al., (1996) são relevantes e podem contribuir para a otimização na pesquisa das larvas, como a obtenção de fezes por três dias consecutivos.

Em relação aos custos do método cultura em placa, observou-se que o valor gasto com o agar é mínimo por amostra, mas a preparação do meio necessita da utilização de uma autoclave, aumentando seus custos e tornando esta técnica um pouco mais laboriosa.

A depressão da imunidade mediada por células parece ser importante fator condicionador de estrogiloidíase disseminada, usualmente decorrente de algumas enfermidades e do uso de corticóides (DIAS et al., 1992; FALLAS et al., 2000). A determinação do número de linfócitos T CD4 no sangue periférico, tem sido utilizada

como marcador da severidade da imunodeficiência, acompanhamento de tratamento e indicador de risco para as principais infecções oportunistas, em decorrência da progressiva destruição dos linfócitos como consequência da replicação viral (BRASIL, 2002). Neste trabalho as contagens dessas células foram avaliadas no grupo de indivíduos HIV-positivos, para verificar se a presença de estrogiloidíase poderia estar associada ao perfil imunológico.

Em relação às contagens de células TCD4+ no grupo HIV positivo, pode-se observar uma significativa tendência de aumento da ocorrência de *S. stercoralis* à medida que diminuem as categorias de células. Entre os indivíduos parasitados, 52,4% apresentaram contagens < 200 células/mm³ e um valor de p= 0,029. Estes achados sugerem que a diminuição dos níveis de células T CD4+, pode estar associada à maior susceptibilidade à infecção por este helminto. No grupo HIV sem estrogiloidíase, 78,7% dos pacientes apresentaram contagens acima de 200 células/mm³ (Tabela 8).

Cimerman et al., (1999) utilizando as técnicas parasitológicas como Hoffman, Faust, Rugai, Kinyoun e auramina –rodamina, relataram a presença de parasitas em pacientes imunossuprimidos com contagens de células CD4+ inferior a 200 células/mm³. Os enteroparasitas em destaque foram *G. lamblia* (26,6%), *C. parvum* (24,4%), *I. belli* (6,6%) e *S. stercoralis* (6,6%), sendo estes responsáveis pelas manifestações diarréicas em pacientes atendidos no Hospital da Universidade Federal de São Paulo.

Existem controvérsias em relação à imunodepressão produzida pela alteração da resposta imune mediada por células, como principal fator de risco para o desenvolvimento da estrogiloidíase sistêmica, embora alguns autores relatem essa associação (MOZZATTO et al., 1999; HERNÁNDEZ; TOLDOS, 2001). Estudos de Fallas et al., (2000), descreveram maior ocorrência de parasitas entre os pacientes com contagens inferior a 200 células/mm³. Contudo, os autores sugerem novas investigações no sentido de esclarecer a associação entre o perfil imunológico e a ocorrência de parasitas nestes pacientes.

Feitosa et al., (2001) não detectaram associação entre parasitas intestinais e alteração da progressão da doença entre os indivíduos HIV. Os parâmetros como CD4 e carga viral foram analisados, e não houve diferença significativa entre os pacientes parasitados e os negativos.

Wehner e Kirsch, (1997) e Trione et al., (2001) relataram a baixa ocorrência de casos publicados até mesmo em áreas onde HIV e estrogiloidíase são endêmicas, sendo que o mecanismo imune que atua na erradicação e prevenção da disseminação desta helmintíase ainda não está totalmente compreendido.

Segundo Dias et al., (1992) e Gutierrez, (2000) a disseminação do *S. stercoralis* em pacientes com AIDS, pode ocorrer devido a outras condições associadas, como terapia com esteróides, pacientes subnutridos e outras infecções intercorrentes.

Considera-se que são necessários maiores estudos para que se possa avaliar a relação entre esta parasitose e AIDS, frente à controvérsia da literatura e à limitação deste estudo.

7 CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- 1- O método cultura em placa foi o mais eficaz no diagnóstico da estrogiloidíase, justificando o emprego desta técnica nos casos suspeitos desta helmintíase.
- 2- A utilização de métodos com baixa sensibilidade para detecção de *Strongyloides stercoralis* pode estar subestimando sua prevalência, a qual necessita do emprego de métodos adequados para seu diagnóstico.
- 3- A ocorrência de *S. stercoralis* foi maior em indivíduos HIV positivos do que em indivíduos HIV negativos.
- 4- O correto diagnóstico de *S. stercoralis* é de grande importância clínica, principalmente quando se considera que a imunossupressão pode levar à disseminação das larvas.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; POBER, J. **Imunologia celular e molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. p. 486.

ARAKAKI, T. et al. Efficacy of agar-plate culture in detection of *Strongyloides stercoralis* infection. **J. Parasitol.**, v.76, n.3, p.425-428, June. 1990.

ATKINS, N. et al. L₃ antigen-specific antibody isotype responses in human *Strongyloidiasis*: correlations with larval output. **Parasite Immunol.**, v.21, n. 10. p.517-526, Oct. 1999.

ATKINS, N. S. et al. Tumoral responses in human *Strongyloidiasis*: correlation with infection chronicity. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 91, p.609-613, Apr. 1997.

BATISTA, R. S. et al. **Medicina tropical: abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias**. In: HUGGINS, D.; MEDEIROS, L. Cultura médica. v.1, 2001. p.275-282.

BELL, D.; DOCKRELL, D. Apoptosis in HIV-1 infection. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v.17, n.2, p. 178-83, Mar. 2003.

BENETTI, A.; BERTUZZO, D. **Estudo da incidência de principais parasitas humanos na comunidade ribeirinha do bairro Canhandúba no Município de Itajaí, durante o primeiro semestre de 2002**. Itajaí, 2002. Monografia. Graduação. Curso de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí.

BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. **Imunologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan. 2002. p. 288.

BLANCO, J. et al. CD4⁺ and CD8⁺ Death during Human Immunodeficiency Virus infection *in vitro*. **Virol.**, v. 285, p. 356-365, 2001.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO AIDS. Ano XV, n. 1, 48^a/2001 à 13^a/2002. Semanas epidemiológicas out de 2001 a março 2002. Disponível em <<http://www.aids.gov.br>> Acesso em : 06 mar. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Contagens de células T CD4⁺ e testes de carga viral: Principais marcadores laboratoriais para indicação e monitorização do tratamento anti-retroviral**. Disponível em : <<http://www.aids.gov.br/assistência/Textom.html>>. Acesso em 02 out. 2002.

CANTOS, G. et al. Prevalência de enteroparasitoses em pacientes ambulatoriais do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. **Rev.Ciên. Saúde**, v. 1.2, p. 23-32, 1995.

CANTOS, G. A. et al. Diagnóstico laboratorial de larvas de nematóides pelo método em placa de cultura. **NewsLab**, 29. ed. p. 162-172, 1998.

CANTOS, G.A. et al. Estudo comparativo da prevalência de enteroparasitas em pacientes atendidos em dois laboratórios de Florianópolis, SC. **NewsLab**, 54. ed. p. 126-130, out./nov. 2002.

CELEDON, J. C. et al. Systemic Strongyloidiasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. **Medicine**, v.73, n.5, p.256-263, 1994.

CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B.; LENI, D. Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with acquire immunodeficiency syndrome in Brazil. **Int. J. Infect. Dis.**, v.3, n.4, p.203-206, 1999.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana**. In: CAMPOS, D.; FERREIRA, M. *Estrongiloidíase* 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 293-303.

COLEBUNDERS, R. et al. Persistent diarrhea, strongly associated with HIV infection in Kinshasa, Zaire. **Am. J. Gastroent.**, v.82, n.9, p. 859-864, Sept. 1987.

COOK, G. C. **Manson's tropical diseases**. 20.ed. São Paulo: Saunders, 1998, p.1394-1399.

COSTA, M.; COSTA, M.; ALMEIDA, L. Parasitismo por *Ascaris lumbricoides* em crianças menores de dois anos: estudo populacional em comunidade do Estado do Rio de Janeiro. **Cad. Saúde Pub.**, Rio de Janeiro, v.15, n.1, p.173-178, 1999.

DE CARLI, G. **Parasitologia clínica**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 809.

DEEMS, D. et al. FACSCount™ The most complete system for measuring absolute CD4, CD8 and CD3 counts. **FACSCount™**, July, 1994, p. 15.

DIAS, R. et al. Ocorrência de *Strongyloides stercoralis* em pacientes portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS). **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v.34, n.1, p.15-17, jan./fev. 1992.

DREYER, G. et al. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: implications for diagnosis and clinical trials. **J. Clin. Microb.**, v.34, n.10, p.2569-2571, Oct. 1996.

ESCOBEDO, A.; NÚÑEZ, F. Prevalence of intestinal parasites in Cuban acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients. **Acta Trop.**, v. 72, p. 125-130, 1999.

EURICO, C.; LITTON, E. **Exames parasitológicos**. 3. ed. Fortaleza: Brasil Tropical, 1999. p. 241.

FALLAS, S. et al. A. *Strongyloides stercoralis*: una discusión sobre su diagnóstico coproparasitológico y su prevalencia en pacientes positivos por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). **Acta Med. Costar.**, San José, v.42, n.1, p.31-34, mar. 2000.

FEITOSA, G. et al. High prevalence of Giardiasis and Strongyloidiasis among HIV-Infected patients in Bahia, Brazil. **Braz. J. Infec. Dis.**, v.5, n.6, p. 339-344, dec. 2001.

FELTZ, M. V. et al. *Strongyloides stercoralis* infection: how to diagnose best? The Netherlands. **J. Med.**, v.55, n.3, p.128-131, Sept. 1999.

FIGUEIREDO, F.; PELOSI, A.; BLOISE, P. Estrongiloidíase disseminada: relato de um caso e revisão da literatura. **J. Bras. Patol.**, Rio de Janeiro, v.36, n.1, p.12-17, 2000.

FONTANET, A. L. et al. Epidemiology of infections with intestinal parasites and human immunodeficiency virus (HIV). Among sugar-estate residents in Ethiopia. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.94, n.3, p.269-278, Feb. 2000.

FORBES, B.; SAHM, D.; WEISSFELD, A. **Diagnostic microbiology**. St. Louis: Mosby. 3. ed. 1998. p.1074.

GARCÍA-ZAPATA, M. et al. Infecções por parasitas oportunistas em pacientes HIV/SIDA positivos no hospital universitário de Brasília. **Brasília Médica**, v.37, n. 1/2, p.14-18, 2000.

GENTA, R. M. Dysregulation of strongyloidiasis: a new hypothesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.5, n.4, p.345-355, Oct. 1992.

_____. Immunobiology of strongyloidiasis. **Trop. Geogr. Med.**, v.36, p.223-229, Apr. 1984.

GUTIERREZ, Y. **Diagnostic pathology of parasitic infections with clinical correlations**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 2000. p. 283-302.

HARCOURT-WEBSTER; SACARAVILLI, F.; DARWISH, A. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in on HIV positive patient. **J. Clin. Pathol.**, v.44, p.346-348, 1991.

HERBERT, D. et al. The role of B cells in immunity against larval *Strongyloides stercoralis* in mice. **Paras. Immunol.**, v.24, n. 2. p.95-10, Feb. 2002.

HERNANDEZ-CHAVARRÍA, H. F. *Strongyloides stercoralis*: un parásito subestimado. **Parasitol. al día**, Santiago, v.25, n.1-2, p.40-49, ene. 2001.

HERNÁNDEZ-CHAVARRIA, F.; AVENDAÑO, L. A simple modification of the Baermann method for diagnosis of strongyloidiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 805-807, Aug. 2001.

HERNÁNDEZ, M.; TOLDOS, C. La significación clínica de la parasitación de *Strongyloides* en nuestro medio. **Rev. Clín. Española**, v.201, n.2, p. 57-58, Feb. 2001.

HERNÁNDEZ, S.; LÓPEZ-LOYO. Estrongiloidiasis e inmunosupresión, estudio anatomopatológico de siete casos. Disponible em: <<http://www.reinaldogodoyeditor.com/subpaginas/estrongiloidiasis.htm>>. Acceso em: 17mar.2003.

HEYWORTH, M. F. Parasitic diseases in immunocompromised hosts. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v.25, n.3, Sept. 1996.

IWAMOTO, T. et al. Larva *Currens*: The usefulness of the agar plate method. **Dermatol**, v.196, p.343-345, Oct. 1998.

JANEWAY, C. et al. **Imunobiologia**. 5. ed. Porto Alegre:Artmed. 2002. p. 347.

JONGWUTIWES, S. et al. Increased sensitivity of routine laboratory detection of *Strongyloides stercoralis* and hookworm by agar-plate culture. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.93, p.398-400, May. 1999.

JOSHI, M. et al. Parasitici diarrhea in patients with AIDS. **Natl. Med. J. India**, Índia, v.15, n. 2, p. 72-74, Mar./Apr. 2002.

KAMINSKY, R. G. Evaluation of three methods for laboratory diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **J. Parasitol.**, v.79, n.2, p.277-280, Apr. 1993.

KINJO, T. et al. Extensive intra-alveolar haemorrhage caused by disseminated Strongyloidiasis. **Int. J. Parasitol.**, v.28, p.323-330, 1998.

KOBAYASHI, J. et al. Studies on prevalence of *Strongyloides stercoralis* infection in Holambra and Maceió, Brazil, by the agar plate fecal culture method. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.38, n.4, p.279-284, July/Aug. 1996.

KOGA, K. et al. An evaluation of the agar plate method for the detection of *Strongyloides stercoralis* in northern Thailand. **J. Trop. Med. Hyg.**, v.93, p.183-188, 1990.

_____. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.45, n.4, p.518-521, 1991.

KOGA, K.; KASUYA, S.; OHTOMO, H. How effective is the agar plate method for *Strongyloides stercoralis*. **J. Parasitol.**, v.78, n.1, p.155-156, Feb. 1992.

LESSNAU, K.; CAN, S.; TALAVERA, W. Disseminated *Strongyloides stercoralis* in human immunodeficiency virus-infected patients. Treatment failure and a review of the literature. **Chest**, v.104, n.1, p.119-122, July. 1993.

LEVI, C. G.; KALLÁS, G. E.; LEITE, K. Disseminated *Strongyloides stercoralis* infection in a AIDS patient: the role of suppressive therapy. **Braz. J. Infect. Dis.**, São Paulo, v.1, n.1, p.48-51, Mar. 1997.

LINDO, J. F. et al. Intestinal parasitic infections in human immunodeficiency virus (HIV-positive) and HIV-negative individuals in São Pedro Sula, Honduras. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.58, n.4, p.431-435, 1998.

LIU, L. X.; WELLER, P. F. *Strongyloides stercoralis* and other intestinal nematode infections. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v.7, n.3, p.655-682, Sept. 1993.

LÓPEZ-MORENO, H.S. Cestodiasis tisulares: participación de los linfocitos T cooperadores 1 y 2. **Salud Pú. Méx.**, Cuernavaca, v. 44, n. 2, p. 145-152, abr./mayo. 2002.

MACHADO, E.; COSTA-CRUZ, J. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlândia city, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 2, p. 161-164, Mar./Apr. 1998.

MAHMOUD, A. A. F. *Strongyloides stercoralis*. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.23, p.949-953, Nov. 1996.

MONTERO, A. et al. Hiperinfección por *Strongyloides stercoralis* como primera manifestación de Sida. **Med.**, v. 56, n. 3, p. 319-320, 1996.

MOZZATTO, L. et al. Estrongiloidíase disseminada. **Rev. Med. HSPV**, v.11, n.24, p.42-46, 1999.

MURRAY, P. et al. **Microbiología médica**. 2. ed. España: Harcourt Broce, 1997.

NEVA, F. A. Biology and immunology of human *Strongyloides stercoralis*. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.153, n.3, p.397-406, Mar. 1986.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 9.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1997, p.297-305.

NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. São Paulo: Atheneu, 2002, p. 247-256;403-401.

NOZAIS, J. et al. Anguillulose disséminée. **La Presse Méd.**, Masson, v. 30, n. 16, p.813-818, avr. 2001.

PANOSIAN, K. J.; MARONE, P.; EDBERG, S. C. Elucidation of *Strongyloides stercoralis* by bacterial colony displacement. **Clin. Infect. Dis.**, v.24, n.1, p.86-88, July 1986.

PARHAM, P. **O Sistema imune**. Porto Alegre: Artmed, 2001. p. 142-153.

- PATIL, P. et al. Fulminant fatal *Strongyloides stercoralis* infection in a post chemotherapy immunosuppressed cancer patient. **Med. Ped. Oncol.** v.33, p.504-505, 1999.
- PAULA, F. M. et al. Parasitological and immunological diagnoses of *Strongyloides stercoralis* in immunocompromised oral non-immunocompromised children at Uberlândia, state of Minas Gerais, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. P.**, São Paulo, v.42, n.1, jan./feb. 2000.
- PEAKMAN, M.; VERGANI, D. **Imunologia básica e clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan, 1999. p. 270.
- PIRES, M. L.; DREYER, G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med.**, São Paulo, v.48, n.4, p.175-182, jul./ago. 1993.
- POIRRIEZ, J. A three years follow-up of total serum IgE levels in three patients treated for *Strongyloides stercoralis*. **Parasite**, v.8, p.359-362, 2001.
- PROOST, P.; SCHOLS, D. Role of chemokines in the HIV infection process. **Verh K Acad Geneeskd Belg.**, v. 64, n. 6, p. 403-420, 2002
- PUNPOOWONG, B. et al. Opportunistic protozoa in stool samples from HIV-infected patients. **J. Trop. Med. Public. Health**, v.29, n.1, p. 31-34, Mar. 1998.
- REY, L. **Parasitologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan, 1991. p. 503-517.
- ROITT, I. **Essencial immunology**. 8. ed. London: Blackwell Science, 1994. p. 304-308.
- ROTH, E. Atualização no exame parasitológico de fezes. **NewsLab**, n. 51, p. 132-134, 2002.
- SALAZAR, S. A.; GUTIERREZ, C.; BERK, S. Value of the agar plate method for the diagnosis of intestinal *Strongyloides stercoralis*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v.23, p.141-145, 1995.
- SANTOS, J.; ORIDES FILHO, P. Baixa sensibilidade do método de cultura de larvas (Harada-Mori) no diagnóstico do Estrongiloidíase. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.29, n.1, p.51-52, jan./fev. 1996.
- SARANGARAJAN, R.; BELMONTE, A. H.; TCHERTKOFF, V. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection diagnosed by gastric cytology in a AIDS patient. **AIDS**, v.11, n.3, p.394-396, 1997 a.
- SARANGARAJAN, R. et al. *Strongyloides stercoralis* infection in AIDS. **AIDS Pat. Care STD.**, v.11, n.6, p.407-414. 1997 b.
- SATO, Y. et al. Efficacy of stool examination for detection of *Strongyloides stercoralis* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.53, n.3, p.248-250, 1995.

- SAVAGE, D. et al. Marked eosinophilia in an immunosuppressed patient with Strongyloidiasis. **J. Intern. Med.**, v.236, p.473-475, 1994.
- SIDDIQUI, A. A.; BERK, S. L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clin. Infect. Dis.**, v.33, n.1, p.1040-1047, Oct. 2001.
- STRATTON, C. W. Strongyloidiasis. **Antim. Infect. Dis. Newsletter**, v.18, n.3, p. 20-24, 2000.
- TABACOF, J. et al. *Strongyloides stercoralis* hiperinfection in two patients with lymphoma, purulent meningitis, and sepsis. **Cancer**, v.68, p.1821-1823, Oct. 1991.
- TARANTO, N. J. *Strongyloides stercoralis* reporte de um caso y revision de la literatura. **Acta Gastroente. Latinoamer.**, v.25, p.113-120, Mayo, 1995.
- TRAJMAN, A.; MACDONALD, T.; ELIA, C. Intestinal immune cells in *Strongyloides stercoralis* infection. **J. Clin. Pathol.**, v.50, n.12, p.991-995, Dec. 1997.
- TRIONE, N. et al. Infecção disseminada por *Strongyloides stercoralis* em pacientes com SIDA. A propósito de 2 observaciones. **Acta Gastroenter. Latinoamer.**, v.31, n.5, p.399-402, nov. 2001.
- UPARANUKRAW, P.; PHONGSRI, S.; MORAKOTE, N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.60, n.6, p.967-973, 1999.
- VERMELHO, L.; SILVA, L.; COSTA, A. **Epidemiologia da Transmissão vertical do HIV no Brasil.** Disponível em <http://www.aids.gov.br/udtv/boletim_jun_ago99/trans_vertical.htm> Acesso em 18 nov. 2002.
- VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias.** 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan. 1991. p. 241.
- VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia.**In: FERNANDES, F. 2. ed. São Paulo:Atheneu, 1997. p. 1319-1323.
- VINEY, M. Exploiting the Life of *Strongyloides ratti*. **Parasitol. Today**, v. 15, n. 6, p. 231-235, 1999.
- VITÓRIA, M. **Parasitoses intestinais em pacientes com infecções pelo HIV/AIDS.** Disponível em: <<http://www.vivacazuza.org.br/revisoes4.htm>>. Acesso em 05 jun. 2002.
- WAYWA, D. et al. Protozoan enteric infection in AIDS related diarrhea in Thailand. **South. Asian J. Trop. Med. Public. Health**, v. 32, suppl 2, p. 151-155, 2001.
- WEHNER, J. H.; KIRSCH, C. Pulmonary manifestations of *Strongyloidiasis*. **Seminars Respirat. Infect.**, v.12, n.2, p.122-129, June 1997.

9 ANEXOS