

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECIOSAS

STEVEEN RIOS RIBEIRO

**ALCOOLISMO E *Strongyloides stercoralis*: INVESTIGAÇÃO DE
POSSÍVEIS FATORES ASSOCIADOS À MAIOR PREVALÊNCIA
DO NEMATÓIDE EM ALCOOLISTAS CRÔNICOS**

VITÓRIA

2017

STEVEEN RIOS RIBEIRO

**ALCOOLISMO E *Strongyloides stercoralis*: INVESTIGAÇÃO DE
POSSÍVEIS FATORES ASSOCIADOS À MAIOR PREVALÊNCIA
DO NEMATÓIDE EM ALCOOLISTAS CRÔNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Doutor em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Fausto Edmundo Lima Pereira

VITÓRIA

2017

Dedicatória

Aos meus pais, Carlos e Eliana e ao meu irmão Slin, pelo amor incondicional.

Aos familiares e amigos, pela confiança e carinho.

... E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor, e que você tem valor diante da vida.

William Shakespeare

Agradecimentos

A Deus, pela vida, força e vontade de vencer.

Ao meu orientador, Prof. Fausto Edmundo Lima Pereira pela paciência, incentivo, apoio, carinho, dedicação, sempre presente em todos os momentos da pesquisa e em momentos decisivos na minha vida profissional. Sou muito grato pela oportunidade de ter sido orientado pelo pesquisador que mais admiro e respeito.

A Profa. Narcisa Imaculada Brant Moreira por ter confiado em mim o laboratório de helmintologia do Departamento de Patologia, projetos de pesquisa, orientações e supervisões de alunos e por toda colaboração no projeto.

A todos os professores do Departamento de Patologia, em especial os professores do Setor de Parasitologia: Profa. Blima Fux, Profa. Cinthia Furst Leroy Gomes Bueloni e Prof. Gustavo Rocha Leite.

A Profa. Liliana Cruz Spano por ter permitido o uso de laboratórios e equipamentos de sua responsabilidade e pelo conhecimento que me proporcionou.

Ao Prof. Daniel Cláudio Oliveira Gomes pela amizade e parceria durante toda execução do projeto.

Ao Dr. Rodrigo Pratte Santos pela assessoria científica com a padronização da técnica de PCR.

A Profa. Sarah Gonçalves Tavares pelo carinho, incentivo e assessoria científica com a técnica de Biologia Molecular, formatação e deposição da sequência de DNA no banco de dados de sequências genéticas – GenBank.

A Mestra Juliana de Freitas Justino por toda ajuda e assessoria científica com a técnica de Biologia Molecular e por ter disponibilizado seu tempo a me ajudar com o sequenciamento de DNA do projeto.

A Dra. Luciana Bueno de Freitas e a Doutoranda Lays Paula Bondi Volpini por toda ajuda e assessoria científica com a técnica de Biologia Molecular e pelo êxito com o sequenciamento de DNA do projeto. Também sou grato pelo carinho, compreensão e atenção que sempre me dedicaram.

Aos amigos e parceiros de pesquisa Luciana Polaco Covre e Lorenzo Lyrio Stringari por me ajudarem a executar grande parte do projeto e me incentivarem a não desistir.

A Profa. Maria da Penha Zago-Gomes pela parceria e pela ajuda com a triagem dos pacientes no ambulatório de alcoolismo do HUCAM.

Aos meus amigos do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes, em especial Marco Antônio, Cleber Vieira, Rose, e Jane Cátia, por me ensinarem a paixão pela Parasitologia e por todo apoio necessário para condução desse estudo.

Ao meu grande amigo Luiz David de Oliveira do Laboratório de Análises Clínicas do HUCAM por ter dedicado tempo e esforço fora de sua jornada de trabalho a me ajudar com triagem de pacientes, coleta de amostras e por toda amizade e dedicação durante a execução do projeto.

A grande amiga Elze Vidal de Faria pela ajuda com a realização dos exames de HTLV-1 e 2 no setor de imunologia do HUCAM e por todo carinho durante a execução dessa etapa do projeto.

As minhas grandes amigas, Doutoranda Cynara Oliveira Possamai e Mestre Luciana Matos de Abreu Stanzani por terem compartilhado comigo: conhecimento, sabedoria, amizade, dedicação, carinho e tempo. Vocês foram indispensáveis para a execução desse projeto e são indispensáveis na minha vida. O amor e gratidão que tenho por vocês vão além desse agradecimento.

Aos meus amigos e colegas de trabalho Técnicos Administrativos em Educação do Departamento de Patologia, em especial a Mestre Simone Bravim Maifrede pela ajuda com a leitura de placas de sorologia.

Aos professores do Curso de Pós-graduação em Doenças Infecciosas, pelos ensinamentos durante nossa formação.

A cada estagiário que passou pelo laboratório de Parasitologia do HUCAM e aos alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado que trabalharam comigo no laboratório de Helminologia do Departamento de Patologia, em especial Caroline Ohnesorge Maia, Débora Goldner Rossi e Vanessa Foeger.

A todos os meus colegas de doutorado em especial a minha grande amiga Dra. Viviane Coutinho Meneguzzi.

Aos meus pais, Carlos e Eliana e meu irmão, Slin, pelo amor incondicional.

Ao meu grande parceiro Luan Fernandes de Souza por dois anos ao meu lado.

A toda minha família e amigos, por acreditarem na minha capacidade e no meu potencial.

A todos os indivíduos que muito gentilmente aceitaram participar dessa pesquisa.

A Universidade Federal do Espírito Santo.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas Prof. Moisés Palaci.

Ao Núcleo de Doenças Infecciosas – UFES, representado pelo Prof. Reynaldo Dietze, pela oportunidade de realizar essa pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) pelo suporte financeiro essencial a condução desse projeto.

A todos aqueles que, de algum modo, me ajudaram na realização desse projeto.

Obrigado!

RESUMO

Introdução. *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1876) é um nematóide intestinal que pode proliferar no hospedeiro, produzir autoinfecção e persistir por décadas, sem nova exposição à infecção exógena. A prevalência do parasita no Estado é mal conhecida. Prevalência mais elevada de *S. stercoralis* em pacientes alcoolistas crônicos do que em não alcoolistas, atendidos no mesmo hospital, tem sido relatada, mas existem dúvidas se existe maior infecção nos alcoolistas, por maior exposição ao parasito ou se a maior sobrevivência e fecundidade das fêmeas no duodeno aumentaria a chance de encontro de larvas nas fezes. **Objetivos.** Avaliar: (a) a prevalência de *S. stercoralis* no Estado em amostras de escolares de 7 a 14 anos e amostras de pacientes atendidos nos diferentes ambulatórios do Hospital Universitário C. A. Moraes (HUCAM) e do Hospital Concórdia em Sta. Maria de Jetibá; (b) a prevalência do parasito em amostras de alcoolistas e não alcoolistas no Serviço de Gastroenterologia do HUCAM e do Hospital Concórdia; (c) o número de larvas rabditoides de *S. stercoralis* nas fezes de alcoolistas e não alcoolistas; (d) os anticorpos IgG anti-*S. stercoralis* no soro e os linfócitos Treg (Treg) no sangue periférico de alcoolistas e não alcoolistas; (e) a utilização do método da PCR convencional em amostras de fezes de alcoolistas e não alcoolistas para confirmar a diferença da prevalência observada entre os dois grupos. **Métodos.** Amostras de fezes foram analisadas ou pelo método de Baermann-Moraes ou HPJ, em amostras dos quais foi feita a contagem de larvas; a pesquisa de anticorpos anti-*S. stercoralis* soro foi feita por ELISA (AccuDiag™ *Strongyloides* IgG ELISA Kit, Diagnostic Automation/Cortez Diagnostics, Inc, California, USA); a pesquisa de LTreg no sangue periférico foi feita por citometria de fluxo; e a PCR com utilização de sondas para amplificar sequências específicas do DNA ribossômico (número de acesso Gene Bank: AF279916). **Resultados.** Prevalência de *S. stercoralis* foi de 0,47% nos escolares e 1,17 nas amostras dos pacientes atendidos nos dois Hospitais. Maior prevalência de exame parasitológico de fezes positivo para *S. stercoralis* foi evidenciada nas duas amostras de alcoolistas e não alcoolistas pelas técnicas parasitológicas ou por detecção de DNA do parasito nas fezes. Foi maior a prevalência de sorologias positivas para *S. stercoralis* em alcoolistas do que em não alcoolistas. Nos alcoolistas infectados com *S. stercoralis*, a eliminação de larvas nas fezes foi significativamente maior do que em não alcoolistas; nos pacientes infectados com *S. stercoralis*, alcoolistas ou não, houve aumento de LTreg no sangue periférico, comparados com o grupo controle, mas sem diferença entre os alcoolistas e não alcoolistas. **Conclusão.** O Estado do Espírito Santo pode ser considerado uma região endêmica para *S. stercoralis*. Maior prevalência de exames parasitológicos positivos, confirmada pela PCR e maior prevalência de anticorpos anti-*Strongyloides* em alcoolistas, do que em não alcoolistas, confirma que o uso abusivo do etanol favorece a infecção com *S. stercoralis*. A maior eliminação de larvas pelos alcoolistas sugere maior carga parasitária ou maior fecundidade das fêmeas no duodeno. Pacientes, alcoolistas ou não, com *S. stercoralis* e alcoolistas sem o parasita mostraram aumento de LTreg no sangue periférico, mas o uso abusivo do etanol não potencializou esse aumento nos alcoolistas com o parasito.

Palavras chaves: *Strongyloides stercoralis*; alcoolismo crônico; linfócitos T reguladores, PCR em fezes.

ABSTRACT

Introduction. *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1876) is an intestinal nematode that can proliferate in the host by autoinfection, and persist for decades without further exposure to exogenous infection. The prevalence of the parasite is poorly known in the state. Higher prevalence of *S. stercoralis* in chronic alcoholic patients than in non-alcoholics, attended at the same hospital, has been reported, but there are doubts about if there is a greater exposure to the parasite or greater survival and fecundity of females in the duodenum would increase the chance of encountering larvae in the feces.

Objectives. To evaluate: (a) the prevalence of *S. stercoralis* in the state on samples of schoolchildren aged 7 to 14 years and samples from patients attended at the different outpatient clinics of the Hospital C.A. Moraes (HUCAM) and Hospital Concórdia at Sta. Maria de Jetibá; (b) the prevalence of the parasite on samples of alcoholics and non-alcoholics in the Department of Gastroenterology of HUCAM and Hospital Concordia; (c) the number of *S. stercoralis* rhabditoid larvae on stools of alcoholics and non-alcoholics patients; (d) the anti-*S. stercoralis* antibodies on serum and Treg lymphocytes (Treg) in peripheral blood in alcoholics and non-alcoholics; (e) the use of the conventional PCR method on stool samples of alcoholic and non-alcoholic patients, to confirm the difference in prevalence observed between the two groups. **Methods.** Stool samples were analyzed either by the Baermann-Moraes method or HPJ, and the larval count was made; the search for anti-*S. stercoralis* antibodies was done by ELISA (AccuDiag™ *Strongyloides* IgG ELISA Kit, Diagnostic Automation/Cortez Diagnostics, Inc, California, USA); Treg research on peripheral blood was done by flow cytometry; the PCR using probes to amplify specific ribosomal DNA sequences (Gene Bank access number: AF279916). **Results.** Prevalence of *S. stercoralis* was 0.47% on stool samples of schoolchildren and 1.17 on samples of the patients attending the two Hospitals. Higher prevalence of positive faecal examinations for *S. stercoralis* was evidenced on two samples of alcoholics and non-alcoholics by parasitological techniques and by DNA detection of the parasite on feces. The prevalence of positive serology for *S. stercoralis* was higher in alcoholics than in non-alcoholics. In alcoholics infected with *S. stercoralis*, the elimination of larvae on feces was significantly higher than in non-alcoholics; in *S. stercoralis* infected patients, alcoholics or not, and in alcoholics without *Strongyloides* infection, there was an increase in the peripheral blood Treg, compared to the non-alcoholic, non-infected control group; but with no difference between alcoholics and non-alcoholics infected groups. **Conclusion.** The state of Espírito Santo can be considered an endemic region for *S. stercoralis*. Higher prevalence of positive parasitological examinations in alcoholics, confirmed by PCR and a higher prevalence of anti-*Strongyloides* antibodies than in non-alcoholics, confirms that the abusive use of ethanol favors infection with *S. stercoralis*. Greater elimination of larvae on feces of alcoholics suggests a greater parasitic load or greater fecundity of females in the duodenum. Patients, alcoholics or not, with *S. stercoralis* and alcoholics without the parasite showed increased Treg in the peripheral blood, but the abusive use of ethanol did not potentiate this increase in alcoholics with the parasite.

Keywords: *Strongyloides stercoralis*; Chronic alcoholism; Regulatory T lymphocytes, PCR in feces.

LISTA DE SIGLAS

μL – microlitro(s)
 μm – micrômetro(s)
APCs – *Antigen-presenting cells* (células apresentadoras de antígenos)
AIDS – *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
Células NK – *Natural killers* (matadoras naturais)
cm – centímetro(s)
dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
Foxp3⁺ – *Forkhead box P3*
h – hora(s)
HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HTLV-1 – *Human T-cell Lymphotropic Virus* (Vírus Linfotrópico da Célula Humana)
IFN-gama – Interferon gama
IgG – Imunoglobulina G
IL-10 – Interleucina 10
IL-13 – Interleucina 13
IL-2 – Interleucina 2
IL-3 – Interleucina 3
IL-33 – Interleucina 33
IL-4 – Interleucina 4
IL-5 – Interleucina 5
KCl – Cloreto de Potássio
L1 – larva rabditóide de primeiro estágio
L2 – larva rabditóide de segundo estágio
L3 – larva filarióide infectante
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
min – minuto(s)
mL – milímetro(s)
mm – milímetro(s)
mM – milimolar
NaCl – Cloreto de Sódio
ng – Nanograma
pb – Pares de base
PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
pM – Picomolar
rpm – Rotações por minuto
TCD25⁺ – Linfócito TCD25 com receptor expresso em sua membrana
TCD4⁺ – Linfócito TCD4 com receptor expresso em sua membrana
Th1 – *T-cell helper 1* (Célula T colaboradora 1)
Th2 – *T-cell helper 2* (Célula T colaboradora 2)
Th17 – *T-cell helper 17* (Célula T colaboradora 17)
TLR – *Toll-like Receptor* (Receptores do tipo *Toll*)
Treg – Linfócito T regulador
U – unidade internacional

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Formas adultas e larvais de *Strongyloides stercoralis* (copiado, com modificações, de Moraes, 1948).....**Pag. 24**
- FIGURA 2.** Ciclo evolutivo de *Strongyloides stercoralis*. Copiado da *Image Library* na página da internet do CDC com modificações (www.cdc.gov).....**Pag. 25**
- FIGURA 3.** Distribuição das densidades ópticas do ELISA para *Strongyloides stercoralis* em pacientes alcoolistas (N=77) e não alcoolistas (N=71), com exame parasitológico positivo ou negativo para o parasito. EtOH(-) Ss(-): não alcoolistas, *S. stercoralis* negativos; EtOH(+) Ss(-): alcoolistas, positivos para *S. stercoralis*; EtOH(-) Ss(+): não alcoolistas, positivos para *S. stercoralis*; EtOH(+) Ss(+): alcoolistas, positivos para *S. stercoralis*.....**Pag. 54**
- FIGURA 4.** Distribuição do número de larvas detectadas em cada exame coproparasitológico em alcoolistas e não alcoolistas. Em A, pelo método de Baermann-Moraes e em B, pelo Hoffman, Pons e Janer (HPJ).....**Pag. 56**
- FIGURA 5.** Frequência de células T reguladoras no sangue periférico de pacientes alcoolistas e controles não alcoolistas, com ou sem infecção por *Strongyloides stercoralis*. EtOH(-) Ss(-): grupo não alcoolista, negativos para *S. stercoralis*; EtOH(+) Ss(-): grupo alcoolista, positivo para *S. stercoralis*; EtOH(-) Ss(+): grupo não alcoolista, positivo para *S. stercoralis*; EtOH(+) Ss(+): grupo alcoolista, positivo para *S. stercoralis*. *** p <0,0005.....**Pag. 57**

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1. Municípios sorteados e incluídos no estudo epidemiológico para avaliação da prevalência de *Schistosoma mansoni* no estado do Espírito Santo, nos quais amostras de fezes de escolares entre 7 e 14 anos de idade foram coletadas e encaminhadas ao laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia, UFES, para avaliação pela técnica de Hoffman, Pons e Janer (HPJ).....**Pag. 40**

QUADRO 2. Sequências oligonucleotídicas de primers obtidos no GenBank com número de acesso AF279916, utilizados para detecção do DNA de *Strongyloides stercoralis* nas fezes.....**Pag. 43**

QUADRO 3. Sequência de bases do DNA ribossômico de *Strongyloides stercoralis* na qual estão inseridas as sequências dos primers (azul e vermelho) utilizadas para a PCR convencional e aquelas utilizadas para sequenciamento (verde e rosa) (Número de Acesso no GenBank: AF279916).....**Pag. 44**

TABELA 1. Prevalência de protozoários e helmintos em 1.320 amostras de fezes de escolares de 7 a 14 anos de idade provenientes de diferentes municípios do estado do Espírito Santo, coletadas no período entre dezembro de 2011 a março de 2013 e analisadas pela técnica de Hoffman, Pons e Janer (HPJ).....**Pag. 50**

TABELA 2. Prevalência de protozoários e helmintos em 3.611 amostras de fezes de pacientes atendidos nos diferentes ambulatórios do HUCAM, Espírito Santo, coletadas no período entre maio de 2013 a julho de 2015 e analisadas pela técnica de Hoffman, Pons e Janer (HPJ).....**Pag. 51**

TABELA 3. Prevalência de *Strongyloides stercoralis* em amostras de fezes de 50 pacientes alcoolistas, 50 não alcoolistas e 1.803 pacientes atendidos nos diferentes ambulatórios do mesmo hospital (Hospital Concórdia) e no mesmo período, entre maio de 2013 a julho de 2015, no município de Santa Maria de Jetibá, ES. As amostras foram analisadas pelas técnicas de Baermann-Moraes (BM) e Hoffman, Pons e Janer (HPJ).....**Pag. 52**

TABELA 4. Prevalência de *Strongyloides stercoralis*, diagnosticado por Hoffman, Pons e Janer e Baermann-Moraes, em amostras de fezes de pacientes alcoolistas

(N=125) e controles não alcoolistas (N=116), atendidos no setor de Gastroenterologia do Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes, Vitória, ES.Pag. 53

TABELA 5. Resultado do teste ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Strongyloides* (IgG) em amostras de soros de pacientes alcoolistas (N=77) e controles não alcoolistas (N=71).....Pag. 53

TABELA 6. Resultado do teste ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Strongyloides* (IgG) em soros de pacientes com presença (*Strongyloides* +) ou ausência (*Strongyloides* -) de larvas de *Strongyloides stercoralis*, detectadas pelo exame parasitológico de fezes.....Pag. 54

TABELA 7. Comparação dos resultados da PCR convencional para o diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* em amostras de fezes de pacientes alcoolistas (N=57) e controles não alcoolistas (N=68)Pag. 55

TABELA 8. Resultado do teste PCR convencional para o diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* em amostras de fezes de pacientes alcoolistas e controles não alcoolistas, com presença (*Strongyloides* +) ou ausência (*Strongyloides* -) de larvas de *S. stercoralis*, detectadas pelo exame parasitológico de fezes.Pag. 55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA.....	Pag. 17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	Pag. 21
2.1. <i>Strongyloides stercoralis</i>: descoberta e histórico.....	Pag. 21
2.2. Morfologia e ciclo-biológico do parasito.....	Pag. 23
2.2.1. <i>Hiperinfecção e formas disseminadas da infecção com S. stercoralis.....</i>	Pag. 29
2.3. Resposta imunológica a <i>Strongyloides stercoralis</i>.....	Pag. 30
2.4. Diagnóstico laboratorial da infecção por <i>Strongyloides stercoralis</i>.....	Pag. 34
2.4.1. <i>Diagnóstico coproparasitológico – exames diretos.....</i>	Pag. 34
2.4.2. <i>Métodos indiretos para diagnóstico de S. stercoralis.....</i>	Pag. 35
2.4.2.1. <i>Identificação de anticorpos anti-Strongyloides no soro.....</i>	Pag. 36
2.4.2.2. <i>Testes intradérmicos.....</i>	Pag. 37
2.4.2.3. <i>Testes imunológicos para detecção de antígenos fecais.....</i>	Pag. 38
2.4.2.4. <i>Métodos de biologia molecular.....</i>	Pag. 38
3. OBJETIVOS.....	Pag. 39
4. MÉTODOS.....	Pag. 40
4.1. Amostras.....	Pag. 40
4.1.1. <i>Amostras para avaliação da prevalência de S. stercoralis no estado do Espírito Santo (2011-2013) e em pacientes atendidos nos diferentes ambulatórios do HUCAM (2013-2015).....</i>	Pag. 40
4.1.2. <i>Amostras obtidas de pacientes atendidos no Hospital Concórdia em Santa Maria de Jetibá, ES (2012-2013)</i>	Pag. 41

4.1.3. Amostras obtidas de pacientes alcoolistas e não alcoolistas atendidos no Ambulatório de Atendimento a Alcoolistas e nas enfermarias do Serviço de Gastroenterologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes.....	Pag. 41
4.1.4. Amostras utilizadas para detecção do DNA de <i>S. stercoralis</i> nas fezes de pacientes alcoolistas e não alcoolistas.....	Pag. 41
4.2. Métodos coproparasitológicos utilizados.....	Pag. 42
4.2.1. Sedimentação espontânea em cálice (Hoffman, Pons e Janer).....	Pag. 42
4.2.2. Método de Baermann-Moraes.....	Pag. 42
4.3. Coleta do sangue para obtenção dos soros.....	Pag. 43
4.4. PCR convencional para detecção de DNA de <i>S. stercoralis</i> nas amostras de fezes.....	Pag. 43
4.5. Sequenciamento do DNA.....	Pag. 45
4.5.1. Edição, avaliação da qualidade e análise das sequências geradas a partir da amostra de DNA selecionada para identificação.....	Pag. 46
4.6. ELISA para pesquisa de anticorpos anti-<i>Strongyloides</i> no soro.....	Pag. 46
4.7. Análise da frequência das populações de linfócitos T reguladores no sangue periférico de pacientes alcoolistas e não alcoolistas com ou sem <i>S. stercoralis</i>.....	Pag. 47
4.8. Diagnóstico do alcoolismo crônico.....	Pag. 49
4.9. Análise estatística.....	Pag. 49
4.10. Aspectos éticos.....	Pag. 49
5. RESULTADOS.....	Pag. 50
5.1. Avaliação da prevalência de <i>S. stercoralis</i> em amostras de escolares do estado do Espírito Santo (2011-2013) e em pacientes atendidos nos diferentes ambulatórios do HUCAM (2013-2015)	Pag. 50

5.2. Avaliação da prevalência de <i>S. stercoralis</i> em amostras de fezes de pacientes alcoolistas e controles não alcoolistas atendidos no Hospital Concórdia de Santa Maria de Jetibá – ES.....	Pag. 51
5.3. Avaliação da prevalência de <i>S. stercoralis</i> em pacientes atendidos no serviço de Gastroenterologia do HUCAM.....	Pag. 52
5.4. Avaliação da pesquisa de anticorpos anti- <i>S. stercoralis</i> (IgG) no soro, utilizando ELISA com antígenos de larvas L3 de <i>S. stercoralis</i>	Pag. 53
5.5. Diagnóstico de <i>S. stercoralis</i> por PCR convencional em amostras de fezes de pacientes alcoolistas e não alcoolistas.....	Pag. 55
5.6. Número de larvas eliminadas nas fezes de pacientes alcoolistas crônicos e controles não alcoolistas.....	Pag. 56
5.7. Avaliação da população de linfócitos T reguladores no sangue periférico de pacientes alcoolistas e controles não alcoolistas, positivos ou não para <i>S. stercoralis</i>	Pag. 57
6. DISCUSSÃO.....	Pag. 58
6.1. Análise da prevalência de <i>S. stercoralis</i> em escolares (7 a 14 anos de idade) no estado do Espírito Santo e em pacientes atendidos na rotina do HUCAM.....	Pag. 58
6.2. Análise da prevalência de <i>S. stercoralis</i> em alcoolistas e não alcoolistas oriundos do município de Santa Maria de Jetibá, ES e atendidos no setor de Gastroenterologia do HUCAM.....	Pag. 59
6.3. Pesquisa de anticorpos anti- <i>Strongyloides</i> (IgG) no soro de pacientes alcoolistas e controles não alcoolistas, utilizando ELISA com antígenos de larvas L3 de <i>S. stercoralis</i>	Pag. 60
6.4. Pesquisa do DNA de <i>Strongyloides stercoralis</i> nas fezes de pacientes alcoolistas e não alcoolistas.....	Pag. 61

6.5. Análise da população de linfócitos T reguladores no sangue periférico de pacientes alcoolistas e controles não alcoolistas, positivos ou não para <i>S. stercoralis</i>	Pag. 62
6.6. Considerações finais	Pag. 64
7. CONCLUSÃO	Pag. 68
8. PROPOSIÇÕES FUTURAS	Pag. 69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Pag. 70
ANEXOS	Pag. 83

1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

Strongyloides stercoralis (Bavay, 1876) é um nematóide intestinal de grande importância por ser um dos únicos enteroparasitos que pode proliferar no hospedeiro, produzindo autoinfecção (LAM *et al.*, 2006). Dessa forma, a estrogiloidíase pode persistir por décadas, sem a necessidade de uma nova exposição à infecção exógena (PRENDKI *et al.*, 2011). A prevalência mundial da estrogiloidíase está estimada em 370 milhões de indivíduos infectados (GREAVES *et al.*, 2013; REQUENA-MÉNDEZ *et al.*, 2013). Contudo, a acurácia dessa estimativa é incerta devido à baixa sensibilidade dos métodos de triagem e diagnóstico, tratamentos incorretos e a falta de acompanhamento dos pacientes infectados pelo parasito. O acompanhamento desses pacientes é essencial, pois, a recorrência da estrogiloidíase em pacientes previamente diagnosticados e tratados para o parasito tem sido relatada (MONTES *et al.*, 2010; DE SOUZA *et al.*, 2014).

No Brasil a prevalência observada ou estimada da infecção com *S. stercoralis* é muito variável, com regiões de baixa (<1%) média (1–5%) e alta endemicidade (>5%) segundo a classificação de Pires e Dreyer (1993). No Espírito Santo, a prevalência é mal conhecida e as observações existentes se referem a prevalência em pacientes atendidos no Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes. Existe uma observação em Cachoeiro de Itapemirim mostrando prevalência de 0,47% em escolares de 8 a 15 anos de idade (CASTRO *et al.*, 2004). A prevalência no HUCAM tem sofrido variações com a mudança do perfil dos pacientes atendidos.

Embora a maioria das pessoas infectadas sejam oligo ou assintomáticas, em condições especiais de imunossupressão, a autoinfecção pode aumentar e induzir formas graves e disseminadas da doença. Em indivíduos submetidos a terapias com corticosteróides, com outros imunossupressores ou co-infectados com o HTLV-1 e *S. stercoralis*, pode haver hiperinfecção ou infecção disseminada podendo levar a morte (GROVE, 1996; KEISER e NUTMAN, 2004; MARQUES *et al.*, 2010; BUONFRATE *et al.*, 2012).

Outros fatores predisponentes ou de risco para infecção com *S. stercoralis* são: **(a)** morar em uma região endêmica; **(b)** desnutrição crônica; **(c)** neoplasias malignas; **(d)** transplante de órgãos; **(e)** doença pulmonar obstrutiva crônica; **(f)** alcoolismo;

(g) insuficiência renal crônica e (h) amamentação em mães infectadas (OLIVEIRA et al., 2002; ZAGO-GOMES et al., 2002; DADA-ADEGBOLA e BAKARE, 2004; SAFDAR et al., 2004; SILVA et al., 2005; MOTA-FERREIRA et al., 2009; MONTES et al., 2010).

Prevalência mais elevada de *S. stercoralis* em pacientes alcoolistas crônicos do que em não alcoolistas, atendidos no mesmo hospital, foi observada em Uberlândia, MG (OLIVEIRA et al., 2002) e em Vitória, ES (ZAGO-GOMES et al., 2002; MARQUES et al., 2010). Nesses trabalhos, a comparação foi feita com controles atendidos no mesmo Hospital, admitindo-se que tenham a mesma procedência dos alcoolistas, mas sem confirmação desta procedência.

Existem observações anteriores que também relataram maior prevalência de *S. stercoralis* em pacientes alcoolistas, mas os autores não comentaram os possíveis efeitos do uso abusivo de etanol na infecção com *S. stercoralis*, ou não utilizaram controles. Gaburri e colaboradores (1997) relataram uma alta prevalência de larvas de *S. stercoralis* no exame parasitológico de fezes de pacientes com cirrose hepática associada com alcoolismo crônico, em um estudo realizado em Juiz de Fora, MG. Avendaño e colaboradores (1999) detectaram 5% de *S. stercoralis* em amostras de fezes de 106 alcoolistas crônicos na Costa Rica, observando uma alta prevalência deste nematóide quando comparada com a prevalência obtida em um inquérito nacional de parasitos intestinais. Adedayo e colaboradores (2002) reportaram 27 casos de estrombiloidíase disseminada na Dominica, observando que o alcoolismo crônico foi um fator relevante associado à infecção em 12 (44,4%) pacientes.

Estudando a prevalência de infecção com *S. stercoralis* em pacientes HIV/AIDS em Uberlândia, Silva e colaboradores (2005) não encontraram diferença significativa na prevalência entre HIV positivos e negativos. No entanto, os autores demonstraram que a prevalência de *S. stercoralis* foi significativamente maior em pacientes HIV/AIDS que faziam uso abusivo de etanol em relação aos pacientes HIV/AIDS não alcoolistas. Resultado semelhante foi observado em estudo prospectivo sobre prevalência do *S. stercoralis* em pacientes HIV positivos, atendidos no HUCAM em Vitória, nos quais se investigou o etilismo crônico e a infecção pelo HIV (GONÇALVES, 2011).

Teixeira e colaboradores (2010) descreveram um caso de hiperinfecção por *S. stercoralis* em paciente do sexo masculino, 51 anos, sem sintomas gastrointestinais ou pulmonares, mas com histórico de anemia e alcoolismo crônico há mais de 20 anos. O paciente não fazia tratamento com corticóides e era negativo para HTLV e para HIV. O grande número de larvas de *S. stercoralis* observadas no exame parasitológico de fezes chamou a atenção dos pesquisadores.

Em contraste com pacientes infectados pelo HIV que raramente apresentam hiperinfecção por *S. stercoralis*, pacientes co-infectados com *S. stercoralis* e HTLV-1 frequentemente desenvolvem hiperinfecção. Uma diferença importante nas duas infecções é que o HTLV-1 ativa as células T CD4⁺ e induz sua proliferação através do aumento de IL-2 e seus receptores, criando um ambiente imunitário inverso ao que ocorre na infecção pelo HIV. O aumento da população de linfócitos T reguladores (CD4⁺, CD25⁺ e Foxp3⁺) foi demonstrado em pacientes com HTLV-1 co-infectados com *S. stercoralis*, admitindo os autores que esse aumento de linfócitos T reguladores seja responsável pela facilitação da infecção através da redução da diferenciação de eosinófilos imposta pela redução de IL-5 relacionada à maior atividade desses linfócitos (MONTES *et al.*, 2009). É possível que uma desregulação imunitária decorrente de alterações em linfócitos T reguladores induzida pelo etanol possa estar relacionada com aumento da sobrevivência ou fecundidade do parasito em alcoolistas crônicos.

Embora Oliveira e colaboradores (2002), Zago-Gomes e colaboradores (2002) e Marques e colaboradores (2010) tenham discutido possíveis mecanismos que justifiquem a maior prevalência de *S. stercoralis* em alcoolistas crônicos, deixam claro que, na realidade, o que se demonstra é maior frequência de exames positivos para *S. stercoralis* em alcoolistas crônicos. Esse achado mais frequente de larvas do parasito nas fezes de alcoolistas crônicos poderia ser resultado de maior prevalência da infecção, mas poderia também ser consequência de maior sobrevivência e fecundidade das fêmeas no duodeno e facilitação da autoinfecção decorrente de efeitos do uso abusivo do etanol.

Tendo em vista que a prevalência de *S. stercoralis* na população do Espírito Santo não seja bem conhecida e que os mecanismos envolvidos na maior prevalência da

infecção desse parasito em alcoolistas crônicos são ainda obscuros, planejamos a presente investigação com a finalidade de: **(a)** avaliar prevalência da infecção com *S. stercoralis* em uma amostra aleatória de escolares de 7 a 14 anos, e nos pacientes atendidos em dois hospitais gerais do Estado, um na capital e outro no interior, para estimar a prevalência do parasito no Estado e para comparação com os alcoolistas atendidos nesses Hospitais; **(b)** avaliar a prevalência de *S. stercoralis* em alcoolistas e não alcoolistas em um serviço que atenda pacientes de mesma procedência, em uma cidade do interior do Estado e no serviço de Gastroenterologia do HUCAM em um período de dois anos; **(c)** quantificar as larvas rabditoides eliminadas nas fezes, realizar sorologia para pesquisa de anticorpos IgG anti-*S. stercoralis* e avaliar os linfócitos T reguladores em alcoolistas e não alcoolistas e **(d)** utilizar o método da PCR convencional em fezes de alcoolistas e não alcoolistas para confirmar a diferença da prevalência observada entre os dois grupos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A estrogiloidíase é uma helmintíase intestinal causada por duas espécies de parasito: *Strongyloides stercoralis* e *Strongyloides fulleborni*, sendo *S. stercoralis* a espécie de maior importância médica no Brasil.

Strongyloides stercoralis (Bavay, 1876) é um nematóide pertencente à família *Strongyloididae* (Classe Secernentea, Ordem Rhabditida, Superfamília Rhabditoidea), que é formada por três gêneros, *Strongyloides*, *Parastrongyloides* e *Leiperinema*. Os membros desta família, também chamados vermes filiformes, são heterogônios, com geração parasitária e de vida-livre e compreendem, pelo menos, 52 espécies (GROVE, 1996).

A prevalência da estrogiloidíase na população pode ser dividida em três categorias: esporádica (<1%), endêmica (1–5%) e hiperendêmica (>5%) (PIRES e DREYER, 1993). O Brasil é considerado um país hiperendêmico com 5,5% de infecção com *S. stercoralis* na população em geral e 11,8% em indivíduos imunocomprometidos, considerando o diagnóstico parasitológico (PAULA e COSTA-CRUZ, 2011).

2.1. *Strongyloides stercoralis*: descoberta e histórico

Este parasito foi descoberto em julho de 1876 por Louis Normand, médico do Hospital Naval em Toulon (França), nas fezes de soldados franceses que retornavam da Cochinchina (Vietnam) razão pela qual, no passado, a doença humana ter sido conhecida como diarreia da Cochinchina (PESSOA, 1978; GROVE, 1996; NOLAN, GENTA e SCHAD, 1998; CAMPOS e FERREIRA, 1999).

Os vermes foram enviados por Normand a Bavay, um professor de farmácia do Hospital Naval em Toulon, que os descreveu com o nome de *Anguillula stercoralis*, no mesmo ano. Bavay também reconheceu que quando as larvas eram mantidas nas fezes por poucos dias sob condições favoráveis, se desenvolviam em vermes adultos de vida livre (machos e fêmeas). Na necropsia de alguns destes soldados que retornavam da Cochinchina e que faleceram devido à diarreia, Normand encontrou larvas por todo o intestino, canais biliares e pancreático e fêmeas adultas no duodeno que, aparentemente, diferiam dos primeiros vermes adultos de vida livre

observados. Pensando tratar-se de uma nova espécie, descreveu-os com o nome de *Anguillula intestinalis*. Isso se justifica pelo fato de que fêmeas parasitas diferem dos adultos de vida livre e os primeiros foram considerados uma espécie diferente. Fortaleceu esta dedução, a descoberta de um segundo tipo de larva, a larva filarióide (posteriormente identificada como a forma infectante) que, na história da estrogiloidíase, foi considerada a larva da segunda espécie, *A. intestinalis*. Muitos pesquisadores divergiram com relação às descobertas subsequentes, pois parecia que havia duas espécies com diferentes ciclos de vida chamados de *A. stercoralis*, no qual a larva rabditóide aparecia nas fezes e os vermes adultos no meio externo, e *A. intestinalis*, no qual os vermes adultos eram parasitas intestinais e que geravam as larvas filarióides (PESSOA, 1978; NOLAN, GENTA e SCHAD, 1998).

Grassi e Parona (1878) demonstraram que a fêmea parasita chamada de *A. intestinalis* punha ovos que se rompiam rapidamente, dando origem a larvas rabditóides que foram conhecidas como *A. stercoralis*. Aparentemente, eles tinham uma cepa homogônica do parasito porque todas as larvas rabditóides se desenvolviam em larvas filarióides infectantes tal como foi descrito para *A. intestinalis*. Grassi (1879) criou uma nova classe que chamou de *Strongyloides* (de strongylos, redondo, e eidos, semelhante) e chamou o parasito de *Strongyloides intestinalis*. Perroncito (1881) descreveu que a larva rabditóide se transformava em machos e fêmeas de vida livre e que estes produziam larvas filarióides, estágio infectante do parasito. Ainda em processo de descoberta, Perroncito não sabia que os diferentes estágios eram partes de um complexo ciclo de vida, alternando vida parasitária e gerações de vida-livre (GROVE, 1996). Perroncito, em 1881, cultivou o verme adulto de vida-livre e o denominou *Pseudorhabditis stercoralis*, a partir da larva rabditóide (conceito já aceito) idêntica à de *A. stercoralis*, descrita por Normand. Leuckart (1883) demonstrou que todas essas formas eram diferentes fases no ciclo de vida de um único parasito. Stiles e Hassal (1902) demonstraram que o parasito deveria ser chamado de *Strongyloides stercoralis* (GROVE, 1996).

Durme (1902), Looss (1905), Ranson (1907) e Fulleborn (1914) mostraram que a infecção ocorria pela penetração ativa na pele e que a larva poderia migrar da pele para intestinos, via circulação, pulmões e traqueia. Gage (1911) demonstrou a ocorrência da autoinfecção (PESSOA, 1978; NOLAN, GENTA e SCHAD, 1998).

Cram (1936-1939), utilizando o parasito *Strongyloides ratti*, introduziu o conceito de que as fêmeas parasitas são partenogenéticas.

2.2. Morfologia e ciclo-biológico do parasito

O parasito *S. stercoralis* possui complexo ciclo de vida e diferentes formas evolutivas. As larvas rabditóides ou de primeiro estágio (não infectantes) medem cerca de 250 μm de comprimento e distinguem pela extremidade anterior romba, esôfago com dois bulbos, vestíbulo bucal pequeno (10 μm) e primórdio genital evidente. As larvas filarióides ou de terceiro estágio (infectantes) medem cerca de 500 μm de comprimento e se distinguem pela cauda “entalhada ou bifurcada”, esôfago cilíndrico e longo, correspondendo a metade do tamanho da larva e vestíbulo bucal curto. As fêmeas parasitas, partenogenéticas, vivem nas criptas da mucosa duodenal e são as maiores formas. Têm aspecto filiforme e medem cerca de 2 mm de comprimento. As fêmeas de vida livre são menores do que as parasitas medem cerca de 0,8 a 1,2 mm de comprimento e apresentam útero desenvolvido cheio de ovos. Os machos são menores do que as fêmeas, e apresentam espículas na extremidade posterior (MORAES, 1948; GROVE, 1996; NEVES, 2009; NUTMAN, 2016). A Figura 1 mostra as diversas formas do parasito com as suas dimensões.

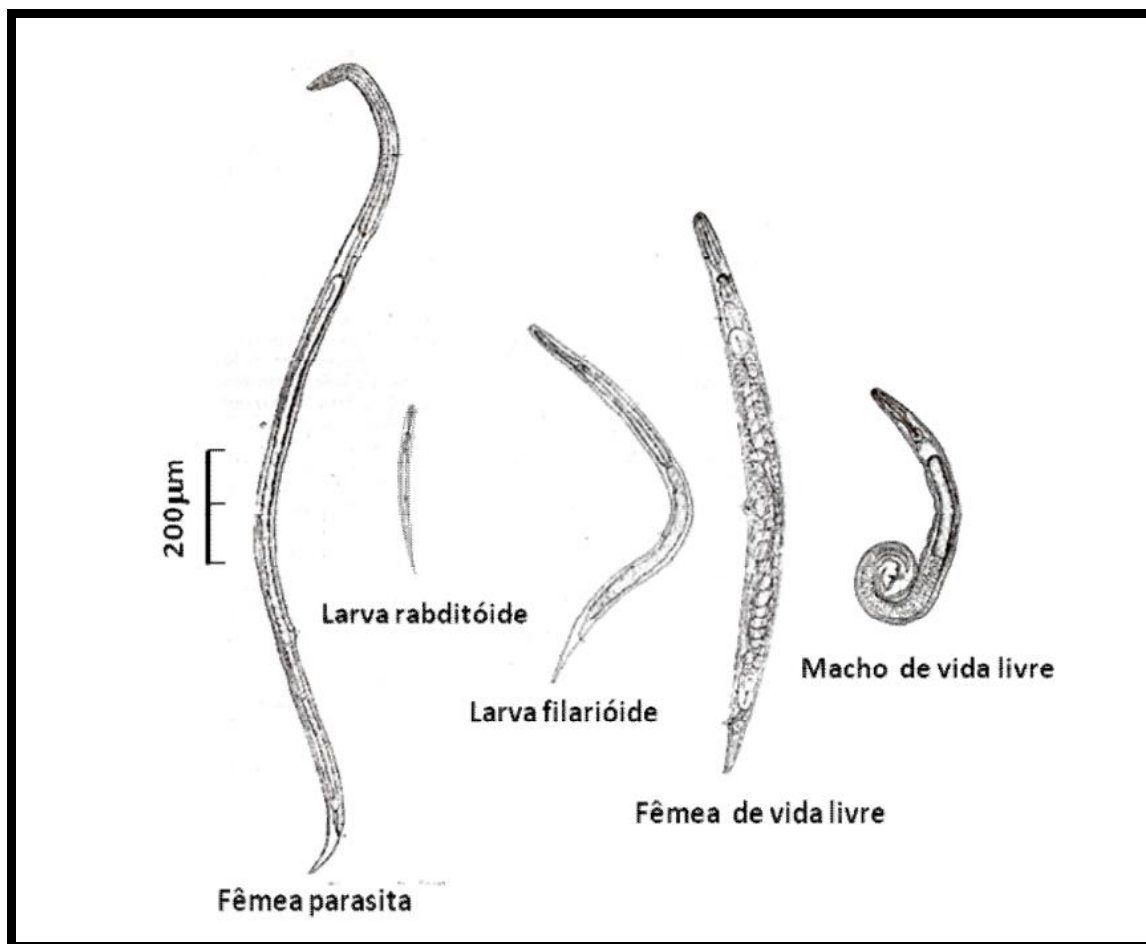


FIGURA 1. Formas adultas e larvais de *Strongyloides stercoralis* (copiado, com modificações, de Moraes, 1948).

O ciclo de vida do parasito é complexo e apresenta uma fase no hospedeiro humano (ciclo direto, homogônico ou ciclo parasitário) e uma fase no meio externo (ciclo indireto, heterogônico ou ciclo de vida livre) (Figura 2).

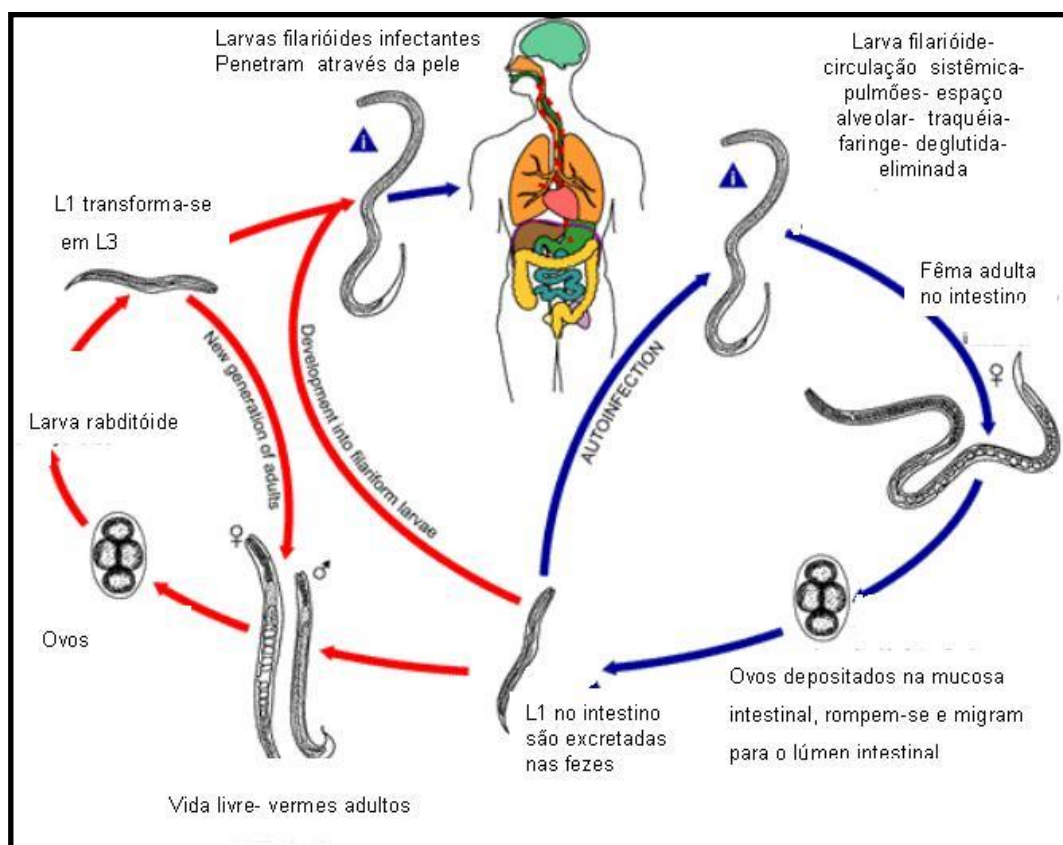


FIGURA 2. Ciclo evolutivo de *Strongyloides stercoralis*. Copiado da *Image Library* na página da internet do CDC com modificações (www.cdc.gov).

O ciclo de vida direto, homogônico ou parasitário começa com a maturação de ovos nas fêmeas partenogênicas, no interior dos quais já se desenvolvem as larvas rabditóides; a postura dos ovos larvados é feita na mucosa duodenal e a eclosão dos ovos é rápida, liberando as larvas rabditóides (L1) que são eliminadas com as fezes. No meio externo, as larvas L1 se alimentam de bactérias e após 24-36 horas sofrem duas mudas, evoluindo para larvas rabditóides de segundo estágio (L2) e finalmente para larvas filarióides infectantes de terceiro estágio (L3). As larvas filarióides infectantes (L3) não se alimentam e sobrevivem de reservas de glicogênio. Larvas filarióides, em condições favoráveis, permanecerão no solo até que entrem em contato com o hospedeiro. Por ação mecânica (movimentação ativa) e química (melanoproteases), as larvas filarióides infectantes penetram na pele do hospedeiro, atravessam os tecidos e caem na circulação venosa e linfática, chegando aos pulmões via pequena circulação. Rompem os alvéolos pulmonares, ascendem por via brônquica até a faringe, podendo ser expulsas com as secreções pulmonares ou

deglutidas. Ao serem deglutidas, chegam ao intestino delgado onde se transformam em fêmeas adultas entre 17 e 21 dias após a penetração através da pele do hospedeiro. Em seguida, inicia-se a ovoposição pela fêmea parasita (fêmea partenogênica). No entanto, há também evidências de que as larvas L3 podem migrar diretamente para o intestino via tecidos conectivos sem passagem pelos pulmões (BRELOER e ABRAHAM, 2016; NUTMAN, 2016).

Ainda no ciclo direto, homogônico ou parasitário, a infecção pode ocorrer de forma interna, denominando-se autoinfecção, ou seja, sem a necessidade de o parasito sofrer as ecdises (L1→L2→L3) fora do corpo do hospedeiro. A ocorrência da autoinfecção depende da evolução de larvas rabditóides para filarióides na luz intestinal, o que pode ser favorecido, por exemplo, por lentidão no trânsito intestinal, fornecendo tempo suficiente às larvas rabditóides (L1) a se transformarem em larvas filarióides (L3) ainda no intestino delgado e grosso. As larvas filarióides diferenciadas na luz intestinal podem penetrar a mucosa do intestino (autoinfecção interna) ou podem penetrar na pele da região perianal (autoinfecção externa) continuando o ciclo de vida dentro do hospedeiro. Não se conhece os mecanismos que podem facilitar a diferenciação de larvas filarióides no intestino, mas a resposta imunitária do hospedeiro parece desempenhar papel importante no processo. Autoinfecção, levando a quadros de hiperinfecção ou infecção disseminada é descrita em algumas condições de imunossupressão. No entanto, como será descrito adiante, os mecanismos exatos da autoinfecção não são ainda conhecidos. Esse fato está associado a doenças imunossupressoras, uso de medicamentos ou ingestão abusiva de bebidas alcoólicas, que causam lentidão no trânsito intestinal (GROVE, 1996; NEVES, 2009; NUTMAN, 2016).

No ciclo de vida indireto, heterogônico ou de vida livre as larvas rabditóides (L1) sofrem quatro mudas e aquelas provenientes de ovos haploides (1n) darão origem à machos de vida livre, enquanto que as larvas rabditóides diploides (2n) originarão as fêmeas de vida livre. Após cópula, as fêmeas de vida livre farão postura de ovos triploides (3n), que darão origem a larvas rabditóides (L1), que sofrem duas mudas e se transformam em larvas filarióides infectantes (L3). A partir dessa fase, o ciclo é semelhante: não se alimentam, possuem sobrevivência de uma a três semanas, período

em que estão aptas a infectar novo hospedeiro (GROVE, 1996; NEVES, 2009; NUTMAN, 2016).

Os casos de parasitismo muito intenso podem ser explicados por constantes autoinfecções (GENTA, 1989; LIU E WELLER, 1993; GROVE, 1996; ADEDAYO, GRELL e BELLOT, 2002).

O ciclo de vida do parasito bem como as causas de autoinfecção, hiperinfecção ou disseminação, ainda não são ainda bem elucidados.

Fulleborn, (1916; apud Schad, Aikens e Smith, 1989) admitiu que a autoinfecção ocorreria através da região perianal de indivíduos infectados, na qual, larvas rabditóides, albergadas em pelos das margens do ânus, transformar-se-iam em larvas filarióides infectantes, causando autoinfecção externa. Faust (1930; apud Schad, Aikens e Smith, 1989) relatou que a autoinfecção interna se daria após as larvas rabditóides se transformarem em larvas filarióides infectantes ainda na luz intestinal, promovendo reinfecção após penetrarem a mucosa do intestino e alcançarem os pulmões, dando continuidade ao ciclo de vida já estabelecido. O mesmo autor afirmou ainda que, em indivíduos com imunidade comprometida, as larvas rabditóides poderiam invadir a mucosa intestinal e iniciar a reinfecção.

Apesar dos mecanismos envolvidos na evolução das larvas rabditóides em filarióides infectantes dentro do hospedeiro ainda serem desconhecidos, já é bem estabelecido que a autoinfecção ocorre com certa frequência, sendo facilitada por variações do estado imunitário do hospedeiro. Schad e colaboradores (1993) mostraram que em infecções estabelecidas (de evolução crônica) a velocidade de maturação das larvas é reduzida e a maioria das larvas rabditoides chega ao meio externo sem terem se transformado em filarióides infectantes, com pequena chance de autoinfecção. No entanto quando animais imunologicamente “virgens” do contato com o parasito são infectados da mesma maneira, as larvas rabditoides eliminadas nas fases iniciais da infecção tem a velocidade de diferenciação em filarióides infectantes aumentada, favorecendo assim uma verdadeira “explosão” de autoinfecção, com consecutivo aumento do numero de fêmeas no duodeno; na medida em que a infecção progride, a velocidade de diferenciação de larvas rabditoide em larvas filarióides diminui e a maioria das larvas é eliminada na forma

rabditoide com poucas larvas L3 disponíveis para autoinfecção. Possivelmente, o estabelecimento da resposta imunitária contra o parasito modula a diferenciação endógena das larvas, diminuindo a chance de autoinfecção. De fato, em gerbilos recém-nascidos, a infecção se estabelece e é seguida de evolução rápida de grande número de larvas rabsitoides para filarióides infectantes, produzindo uma “explosão” de autoinfecção até 30 dias após a inoculação das larvas infectantes (NOLAN *et al.*, 1999). Da mesma forma, em hospedeiros tratados com corticosteróides ou outras drogas imunossupressoras há um aumento explosivo de autoinfecção, levando a hiper infecção, corroborando que a resposta imunitária do hospedeiro é importante no processo de evolução das larvas rabsitoides ainda no intestino (SCHAD, HELLMAN e MUNCEY, 1984; NOLAN *et al.*, 1993).

Uma das características da infecção com *S. stercoralis* é a sua cronicidade e a permanência das fêmeas partenogênicas por longo tempo no duodeno, mesmo em pacientes assintomáticos com baixa eliminação de larvas nas fezes. Esse fato é sugerido quando se estuda a prevalência do parasito em diferentes faixas etárias: a prevalência tende a aumentar com o avançar da idade, sugerindo que: **(a)** o parasito tem grande longevidade, **(b)** a reinfecção ocorre com facilidade ou ainda, **(c)** a autoinfecção mantém o parasito no duodeno. A maioria dos autores sugere que a autoinfecção seria o mecanismo mais importante na manutenção de infecções crônicas assintomáticas por longos períodos. Essas infecções têm sido demonstradas em observações em pacientes que adquiriram o parasito em uma área endêmica e se mudaram para área onde a infecção com o parasito é improvável e décadas depois ainda eliminavam larvas rabsitoides nas fezes (GILL e BELL, 1979; GROVE, 1980). Recentemente, Prendki e colaboradores (2011) reportaram o caso de um homem de 83 anos de idade que vivia em Paris e buscou o serviço de saúde com queixas de fadiga, perda de peso e com hipereosinofilia ($2,4 \times 10^9$ células/L), cujo diagnóstico para *S. stercoralis* foi confirmado. O paciente relatou que há 75 anos morou no Vietnã e a única viagem realizada depois de mudar-se para Paris foi feita às Ilhas Canárias 15 anos antes de adoecer. Os autores afirmaram que não havia evidências da transmissão de *S. stercoralis* nas Ilhas Canárias, que o paciente havia se hospedado em hotel de alto padrão e que não tinha hábito de andar descalço. Concluíram, portanto, que se tratava de um possível caso de infecção de

grande duração, possivelmente mantida por autoinfecção. Casos semelhantes têm sido relatados em ex-prisioneiros ingleses da segunda guerra mundial que combateram no oriente, em zonas endêmicas para *S. stercoralis* (GROVE, 1980).

2.2.1. Hiperinfecção e formas disseminadas da infecção com *S. stercoralis*

O termo hiperinfecção é empregado para denominar uma autoinfecção com grande migração de larvas nos órgãos normalmente envolvidos no ciclo pulmonar do parasito; geralmente se acompanha de manifestações gastrointestinais e pulmonares e se caracteriza pela grande quantidade de larvas nas fezes ou no escarro. Como as larvas podem carrear bactérias intestinais, pode ocorrer infecção sistêmica e sepse grave ou choque séptico (GROVE, 1996; GREAVES *et al.*, 2013; BRELOER e ABRAHAM, 2016; NUTMAN, 2016).

A expressão infecção disseminada é utilizada para indicar migração de larvas para órgãos ectópicos, ou seja, fora do ciclo pulmonar do parasito. Essa disseminação pode se acompanhar de manifestações sistêmicas graves, especialmente as relacionadas com a presença de bactérias intestinais transportadas pelo parasito ou que ganharam a circulação a partir das lesões na mucosa, deixadas pelas larvas. No entanto, existem formas de infecção disseminada onde as manifestações podem ser discretas ou relacionadas a uma localização das larvas. Meningite por gram negativos, geralmente com eosinofilia no líquido, pode ser manifestação isolada de estrogiloidíase disseminada (GROVE, 1996; NUTMAN, 2016). A disseminação de larvas sem manifestações evidentes é mal conhecida no homem, mas é bem evidenciada na infecção experimental de cães com *S. stercoralis* (SCHAD, HELLMAN e MUNCEY, 1984).

Ainda que hiperinfecção e infecção disseminada sejam conceituadas como diferentes, muitas vezes é difícil identificar o que está ocorrendo em uma estrogiloidíase grave, se não houver identificação da localização das larvas. Por isso, há uma certa confusão na identificação dessas situações e seria preferível denominar as hiperinfecções e as formas disseminadas como formas graves de estrogiloidíase (GROVE, 1996). De fato, nas revisões importantes que discutem o assunto, não há um consenso nos conceitos das duas situações: Greaves e colaboradores (2013) e Breloer e Abraham (2016) relatam que na hiperinfecção

ocorre disseminação de larvas incluindo fígado e cérebro, o que na revisão feita por Nutman (2016) se considera essa situação como infecção disseminada. Talvez seria melhor considerar que uma autoinfecção acelerada pode resultar em hiperinfecção (larvas migrando nos órgãos do ciclo pulmonar do parasito) ou com hiperinfecção associada com disseminação de larvas para órgãos fora do ciclo pulmonar do parasito.

As duas situações – hiperinfecção e infecção disseminada – estão, geralmente, mas não exclusivamente, associadas com estados de imunossupressão. No entanto, não são todos os estados de imunossupressão que induzem facilmente a exacerbação da autoinfecção e disseminação de larvas do parasito. Tratamento com corticoides é a condição que mais se associa a formas disseminadas do parasito que é relatada também na quimioterapia antineoplásica, em pacientes transplantados, mas não ocorre com a frequência que seria esperada em pacientes com SIDA, apesar da drástica redução da imunidade celular nesses pacientes. Como será discutido adiante os mecanismos imunitários envolvidos na exacerbação da autoinfecção com disseminação de larvas são ainda pouco conhecidos. Por exemplo, infecção com *S. stercoralis* e disseminação de larvas em pacientes diabéticos tem sido descritas sem esclarecimento dos mecanismos envolvidos (HAYS *et al.*, 2015). Em estudo que avaliou 78 pacientes portadores de diabetes tipo 2 no ambulatório de Endocrinologia da Universidade Federal de Uberlândia, MG e em um grupo controle atendido no mesmo ambulatório, Mendonça e colaboradores (2006) demonstraram maior prevalência de sorologia positiva para *Strongyloides* em diabéticos do que em não diabéticos, mas admitem não existir uma explicação clara para a associação da infecção com o parasito com o diabetes.

2.3. Resposta imunológica a *Strongyloides stercoralis*

A resposta imunitária a *S. stercoralis* no homem não é bem conhecida. As informações disponíveis obtidas em poucos estudos transversais em humanos e em estudos experimentais sugerem que há participação efetiva da imunidade inata, de anticorpos e de imunidade celular nos mecanismos de proteção contra o parasito.

Os estudos em humanos mostram que há indução de resposta Th2 com produção de IgM, IgG, IgA e IgE anti diferentes antígenos existentes no extrato bruto do parasito ou de suas larvas. Alguns estudos realizados em períodos recentes após a infecção mostraram que há uma elevação rápida de IgE, IgG1 e IgG2, seguida mais tardiamente de elevação de IgG4. IgE e IgG4 são específicos para o mesmo grupo de antígenos, sendo possível que a IgG4 atue como bloqueador da resposta efetora da IgE, indispensável para eliminar o parasito, modulando esta resposta e permitindo maior sobrevivência das fêmeas no duodeno (revisão em NUTMAN, 2016).

Observações mais recentes, com investigação de produção de citocinas em diferentes fases da infecção, demonstram que há produção inicial de IFN γ e TNF α , seguida de aumento progressivo de citocinas TH2 (IL-4, 5, 9, 10, 13), com redução da resposta Th1 (IFN γ e TNF α) e Th17, induzida pela IL-10. Após o tratamento com erradicação do parasito, as citocinas TH2 circulantes voltam aos seus níveis normais (ANURADHA *et al.*, 2015a e 2015b).

A participação de linfócitos T reguladores (Treg) não está bem estabelecida na infecção com *S. stercoralis*, mas o envolvimento dessas células na sobrevivência do parasito é suspeitado porque tem sido demonstrado em outras helmintíases humanas ou em modelos experimentais (WAMMES *et al.*, 2012; BLANKENHAUS *et al.*, 2014). Há evidências indiretas de que Treg possam ser importantes no controle do parasito, deduzidas da observação de que na infecção pelo HTLV-1, que se associa frequentemente a formas disseminadas, há um aumento significativo de Treg induzido pelo vírus e relacionada com a redução de IL-5, responsável pela eosinofilia, importante na resistência às larvas durante a migração tecidual (MONTES *et al.*, 2009).

As informações mais completas sobre o mecanismo de resistência às larvas de *S. stercoralis* são decorrentes de observações experimentais nas quais larvas L3 do parasito são colocadas em câmaras de difusão, implantadas no tecido subcutâneo de camundongos. Esse modelo permite verificar a ação de células sobre as larvas (câmaras com poros que permitem a passagem de leucócitos) ou de mecanismos exclusivamente humorais (câmaras com poros que impedem a entrada de células).

Os autores que utilizaram esse modelo, utilizaram-no nas mais diferentes condições experimentais em camundongos previamente sensibilizados ou não, com diferentes antígenos do parasito, em camundongos geneticamente modificados (nocauteados ou transgenes para diferentes citocinas e moléculas da imunidade inata), camundongos geneticamente modificados para indução de perda total ou parcial da resposta adaptativa, camundongos submetidos a tratamentos que eliminam células ou neutralizam moléculas, entre outros. As publicações com utilização desse modelo para estudo de *S. stercoralis* são numerosas e foram recentemente resumidas em uma revisão sistemática por Breloer e Abraham (2016). Nessa revisão, os autores resumem, no fim de cada item as conclusões que os experimentos permitiram inferir.

O controle da sobrevivência de larvas L3 de *S. stercoralis* no modelo descrito acima, tem participação da imunidade inata e da adaptativa. Breloer e Abraham (2016) baseados na revisão feita, propõem que as larvas L3 que migram no hospedeiro são agredidas inicialmente pela resposta inata: Padrões moleculares associados a patógenos ou PAMPs (*Pathogen-associated Molecular Pattern*) liberados pelo parasito, são reconhecidos em TLRs em diversas células do tecido e liberam quimiotáticos e citocinas que atraem os primeiros leucócitos; neutrófilos se aderem as larvas e executam o processo de formação das armadilhas extracelulares (NETs, *Neutrophil Extracellular Traps*) que aprisionam as larvas e liberam quimiotáticos que atraem mais neutrófilos e eosinófilos, que liberam produtos dos grânulos sobre a larvas, com auxílio do complemento, matando-as. Os eosinófilos têm a capacidade de endocitar antígenos e apresentá-los nos tecidos linfáticos para montagem da resposta adaptativa. Segundo os mesmos autores, a resposta adaptativa é iniciada pela apresentação de antígenos por eosinófilos estimulando linfócitos T CD4 a produzir citocinas TH2 (IL-4, IL-5). A participação dos linfócitos da imunidade inata tipo 2 (ILC2, *Innate Lymphoid Cells*), exsudados e estimulados precocemente por ação de IL-33 liberadas por células do tecido onde a larva penetra (especialmente nos pulmões), na indução da resposta Th2 tem sido demonstrada em alguns experimentos com *S. venezuelensis*, mas ainda não para o *S. stercoralis*. Linfócitos B produzem IgM que atua em colaboração com IgG, macrófagos alternativamente ativados (M2) e neutrófilos para matar as larvas. Eosinófilos não

são importantes na morte de larvas executada pela resposta adaptativa, mas são indispensáveis para a produção de IgM. A ativação do complemento, especialmente de C3, é importante nos mecanismos da resposta adaptativa envolvidos na morte das larvas.

Os mecanismos imunitários envolvidos na eliminação das fêmeas adultas no duodeno são pouco conhecidos na infecção humana com *S. stercoralis*. Em infecções de roedores com *S. venezuelensis* e *S. rattii* se demonstra que a expulsão dos vermes depende de mastócitos que aumentam na mucosa após o estabelecimento do parasito, sendo indispensáveis para a sua expulsão. A mastocitose da mucosa é dependente da resposta Th2, especialmente de IL-3 que induz proliferação de precursores de mastócitos na medula óssea. A ativação dos mastócitos para expulsão dos vermes depende de IL-3, IL-9 e anticorpos IgG e IgE específicos para antígenos do parasito. Os mastócitos ativados liberam produtos armazenados ou sintetizados após estimulação (histamina, serotonina, proteases, proteoglicanos; prostaglandinas, leucotrienos e algumas citocinas, entre outros) os quais agem nos tecidos da mucosa aumentando a motilidade do músculo liso intestinal, especialmente da muscular da mucosa e aumentando a permeabilidade vascular, favorecendo a eliminação de macromoléculas para a luz intestinal, as quais podem agir sobre o parasito. No entanto, as observações sobre esses mecanismos são fragmentadas e ainda não permitem a compreensão de todas as etapas do processo. O que se sabe é que a resposta Th2 e a mastocitose são indispensáveis para o processo (BRELOER e ABRAHAM, 2016).

Os mecanismos que permitem a sobrevivência das fêmeas partenogênicas de *S. stercoralis* no duodeno são pouco conhecidos. Algumas observações experimentais na infecção com *S. rattii* ou *S. venezuelensis* em roedores mostram que a participação de Treg pode ser importante no retardo da expulsão das fêmeas, especialmente por induzir redução na produção de IL-9. No entanto, a partir de infecções em cepas diferentes de camundongos, demonstrou-se que em camundongos C57BL/c a depleção de Treg não alterou a carga parasitária, ao contrário do observado na infecção em camundongos BALB/c. Outros mecanismos reguladores devem estar envolvidos e um deles é mediado pela expressão de moléculas reguladoras de linfócitos B e T (BTLA, *B and T Lymphocytes Attenuator*) ativadas por um ligante

da família TNF (HVEM, *Herpes Virus Entry Mediator*) que induz redução na produção de IL-9 (BRELOER e ABRAHAM, 2016).

2.4. Diagnóstico laboratorial da infecção por *Strongyloides stercoralis*

2.4.1. Diagnóstico coproparasitológico – exames diretos

O diagnóstico da estrogiloidíase humana é feito, usualmente, pela detecção de larvas nas amostras fecais com utilização de técnicas coproparasitológicas.

Na maioria das infecções por *S. stercoralis*, a carga parasitária e a eliminação de larvas nas fezes são baixas (GENTA *et al.*, 1986; NEVA, 1986; LIU e WELLER, 1993; UPARANUKRAW *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2003; DE CARLI, 2007), razão pelo qual os exames coproparasitológicos de rotina ainda apresentam baixa sensibilidade para a sua identificação (DREYER, 1996; DE PAULA *et al.*, 2000; SIDDIQUI e BERK, 2001; GREINER *et al.*, 2008).

Em 1919, Lutz introduziu o método de sedimentação espontânea em cálice utilizando amostras de fezes filtradas em telas de arame ou musseline. Hoffman, Pons e Janer (1934) modificaram a técnica de Lutz e introduziram o método baseado na sedimentação espontânea, utilizando a gravidade como forma de concentração de larvas após diluição de pequena amostra fecal em água. Essa técnica é rotineiramente utilizada nos laboratórios de análises clínicas, mas utiliza pouca quantidade de amostra e, ao final do processamento, apenas uma alíquota do sedimento obtido é analisado. Por essa razão, a sua sensibilidade é muito baixa.

A técnica de Baermann-Moraes descrita originalmente por Baermann (1917) para detecção e isolamento de larvas do solo, foi em 1948 adaptada por Moraes para diagnóstico de larvas em fezes, método cujo princípio se baseia em quatro características intrínsecas às larvas, são elas: termotropismo, hidrotropismo, fototropismo e tigmotropismo positivos. Esse método é mais sensível que a sedimentação espontânea, permite uma avaliação quantitativa das larvas eliminadas, mas apresenta restrições, que são utilização obrigatória de fezes frescas sem conservantes e presença de larvas viáveis na amostra.

O cultivo de fezes em Ágar para diagnóstico de larvas foi introduzido por Arakaki em 1988 e modificado por Koga em 1991. Baseia-se no princípio que as larvas migram facilmente das fezes para o Ágar, carreando bactérias da flora intestinal presente na amostra, formando “caminhos e rastros” visíveis macroscopicamente e confirmados microscopicamente. A sensibilidade desse método é semelhante à do Baermann-Moraes, embora alguns autores admitem ser um pouco menos sensível (SUKHAVAT *et al.*, 1994; SATO *et al.*, 1995; STEINMANN *et al.*, 2007; KNOPP *et al.*, 2008) e outros o consideram mais sensível (SALAZAR *et al.*, 1995; CAMPO-POLANCO *et al.*, 2014; POCATERRA *et al.*, 2017).

A técnica de Harada-Mori (1955) baseia-se no princípio da eclosão de ovos e migração de larvas. Consiste em colocar uma amostra de fezes (1 a 2 g) espalhadas sobre uma tira de papel filtro de cerca de 150x15 mm que é colocado em tubo de ensaio de 18x180 mm ou de 20x200 mm, contendo 7 mL de água destilada, de maneira que a água não toque nas fezes, mas que, por capilaridade, humedeça toda a tira de papel e conseqüentemente as fezes. Em seguida, veda-se o tubo com plástico ou papel celofane, conservando o tubo em posição vertical durante 24 a 48 h, à temperatura de 24-28 °C. Por fim examina-se a água do fundo do tubo, com uma lupa, a fim de observar se existem larvas (PESSÔA e MARTINS, 1978). Essa técnica tem a desvantagem de examinar pequena quantidade de fezes e o tempo mínimo de observação (24 horas) permite que ovos de ancilostomídeos sofram eclosão, levando à necessidade de exame morfológico das larvas para sua identificação.

2.4.2. Métodos indiretos para diagnóstico de *S. stercoralis*

Embora os métodos coproparasitológicos sejam rotineiramente utilizados para o diagnóstico de *S. stercoralis* por terem boa sensibilidade e baixo custo, infecções com baixa carga parasitária podem não ser detectadas. Por esses motivos, métodos indiretos de diagnóstico têm sido investigados para identificação do parasito, incluindo: (a) identificação de anticorpos parasito-específicos no soro e outros líquidos corpóreos, (b) intradermoreações de resposta imediata com uso de antígenos do parasito e (c) identificação de antígenos do parasito nas fezes por método imunológico ou por biologia molecular.

2.4.2.1. Identificação de anticorpos anti-*Strongyloides* no soro

A identificação de anticorpos anti-antígenos de larvas de *S. stercoralis* no soro, pode ser realizada pelos métodos de aglutinação, imunofluorescência indireta e ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*); utilizando antígenos das diversas formas do parasito.

O teste de hemaglutinação indireta de partículas sensibilizadas com antígenos de *Strongyloides* foi introduzido em 1987 por Gam e colaboradores, mas foi pouco utilizado. A técnica foi novamente introduzida em 1991 por Sato e colaboradores utilizando fração solúvel do extrato de larvas filarióides de *S. stercoralis* obtidas de cultura de fezes. Quando comparado com ELISA, a hemaglutinação demonstrou boa sensibilidade e especificidade, ambos utilizando antígenos semelhantes, sejam eles de *S. stercoralis* ou *S. ratti* (SATO *et al.*, 1991; HUAMAN *et al.*, 2003; SITHITHAWORN *et al.*, 2005). Esse teste foi utilizado em alguns estudos de prevalência do parasito, por ser de fácil execução, mas tem sido substituído pelo ELISA nos últimos anos.

A imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti-*S. stercoralis* foi inicialmente proposta por Grove e Blair em 1981 e por Genta e Weil em 1982. Posteriormente, Costa-Cruz e colaboradores (1997) propuseram a utilização de cortes em criostato de larvas de *S. stercoralis* e *S. ratti* para utilização da técnica, obtendo sensibilidade e especificidade acima de 90%.

O método de ELISA tem sido utilizado por diversos pesquisadores como método diagnóstico alternativo às técnicas coproparasitológicas desde a década de 1980. Os antígenos mais utilizados para sensibilização de placas nesse diagnóstico são frações solúveis obtidas de larvas filarióides de *S. stercoralis*; *S. ratti* ou *S. venezuelensis*, extraídos com diferentes processos. De modo geral a sensibilidade e a especificidade dos testes com antígenos extraídos de larva são boas, geralmente entre 70 e 90%. Sensibilidades mais baixas foram observadas com antígenos extraídos de ovo, de vermes adultos ou de antígenos de larvas extraídos com detergentes (LEVENHAGEN e COSTA-CRUZ, 2014). Esse método possibilita a identificação de diferentes isotipos de IgG, IgE e IgA, não só no soro como em saliva (COSTA-CRUZ *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2010).

Uma técnica menos usual, mas mais específica, é o Western blot para identificação de frações antigênicas mais específicas dos antígenos solúveis de larvas do *S. stercoralis*. Frações de 41, 31 e 28 KD de *S. stercoralis* foram melhor reconhecidas por soros (IgG) de pacientes com o parasito ou com suspeita clínica (reconhecimento acima de 88% dos soros) do que por soros de pacientes com outras helmintíases dos quais apenas 17% reconheceram uma das frações (CONWAY *et al.*, 1993 e 1994).

Uma técnica recentemente introduzida utilizando antígenos recombinantes do *S. stercoralis* conjugados com luciferase, a imunoprecipitação com luciferase, (*Luciferase Immunoprecipitation System*, LIPS) tem mostrado resultados promissores, com especificidade se aproximando de 100%. No entanto, o método é trabalhoso, dispendioso e ainda necessita de padronização para diagnóstico da estrogiloidíase humana (LEVENHAGEN e COSTA-CRUZ, 2014).

Testes rápidos imunocromatográficos embora estejam sendo desenvolvidos não são ainda padronizados e dependem de antígenos de *S. stercoralis* mais difíceis de serem obtidos (LEVENHAGEN e COSTA-CRUZ, 2014).

Testes para detecção de imunocomplexos circulantes formados com antígenos do parasito são importantes porque indicam infecção presente e podem ser muito úteis no diagnóstico da doença em pacientes imunocomprometidos. Entretanto, têm a desvantagem de serem técnicas trabalhosas e dispendiosas (LEVENHAGEN e COSTA-CRUZ, 2014).

2.4.2.2. Testes intradérmicos

Testes intradérmicos para diagnóstico de *S. stercoralis* foram introduzidos Brannon e Faust (1949) com inoculação de antígenos de *S. fulleborni*. Entretanto, apesar da boa sensibilidade obtida com antígenos de larvas filarióides, Neva e colaboradores (2001) discutem a ocorrência de resultados falso-positivos em pacientes infectados com outros helmintos. Esses autores sugerem a utilização de antígenos recombinantes, mais especificamente reconhecidos por IgE e que aumentariam a sensibilidade do teste.

2.4.2.3. Testes imunológicos para detecção de antígenos fecais

Antígenos fecais (coproantígenos) do parasito podem ser detectados por ELISA de captura. As placas são sensibilizadas com anticorpos de soros policlonais ou monoclonais. Os resultados obtidos com soros policlonais para pesquisa de *S. stercoralis* em humanos mostraram boa sensibilidade e especificidade – os autores relatam que não foram observadas reações cruzadas. (EL-BADRY, 2009, SYKES e MCCARTHY, 2011).

2.4.2.4. Métodos de biologia molecular

Um diagnóstico mais sensível e específico da estrogiloidíase pode ser feito pela detecção de DNA do parasito nas fezes (FORMENTI *et al.*, 2016; NGUYEN *et al.*, 2016; PAULA *et al.*, 2016). A reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo investigada com esses propósitos, demonstrando altas sensibilidade e especificidade. (VERWEIJ *et al.*, 2009; KRAMME *et al.*, 2010; AHMAD *et al.*, 2013; KNOPP *et al.*, 2014; SITTA *et al.*, 2014). A PCR para identificar *S. stercoralis* pode ser realizada como: **(a)** PCR convencional, cujo objetivo é apenas detecção qualitativa de moléculas de DNA de *S. stercoralis*, **(b)** PCR Multiplex, com a finalidade de detecção simultânea de fragmentos de DNA de diferentes helmintos intestinais (*Ancylostoma*, *Necator americanus*, *Ascaris lumbricoides* e *S. stercoralis*) e **(c)** PCR em tempo real (*Real-Time* PCR), técnica quantitativa que consegue realizar a avaliação do número de moléculas de DNA amplificadas a cada ciclo. A PCR em tempo real, apresenta maior reprodutibilidade, sensibilidade e precisão quando comparada com a PCR convencional. Estudos têm demonstrado bons resultados em relação a sensibilidade e especificidade da técnica de PCR (BASUNI *et al.*, 2011; BECKER *et al.*, 2015; INCANI *et al.*, 2016; LLEWELLYN *et al.*, 2016).

3. OBJETIVOS

Tendo em vista que a prevalência de *S. stercoralis* na população do Espírito Santo não seja bem conhecida e que os mecanismos envolvidos na maior prevalência da infecção desse parasito em alcoolistas crônicos são ainda obscuros, planejamos a presente investigação com a finalidade de:

3.1. Avaliar prevalência da infecção com *S. stercoralis* em uma amostra aleatória de escolares de 7 a 14 anos e em uma amostra de pacientes atendidos nos diferentes ambulatórios do HUCAM e no Hospital Concórdia em Santa Maria de Jetibá, para estimar a prevalência do parasito no Estado e para comparação com os alcoolistas atendidos nos mesmos Hospitais;

3.2. Avaliar a prevalência de *S. stercoralis* em alcoolistas e não alcoolistas no Hospital Concórdia, que atende pacientes de mesma procedência;

3.3. Avaliar a prevalência de *S. stercoralis* em pacientes alcoolistas e não alcoolistas atendidos no serviço de Gastroenterologia do HUCAM;

3.4. Quantificar as larvas rabaditoides de *S. stercoralis* eliminadas nas fezes; realizar sorologia para pesquisa de anticorpos IgG anti-*S. stercoralis* e avaliar os linfócitos T reguladores em alcoolistas e não alcoolistas;

3.5. Utilizar o método da PCR convencional em amostras de fezes de alcoolistas e não alcoolistas para confirmar a diferença da prevalência observada entre os dois grupos.

4. MÉTODOS

4.1. Amostras

4.1.1. Amostras para avaliação da prevalência de *S. stercoralis* no estado do Espírito Santo (2011-2013) e em pacientes atendidos nos diferentes ambulatórios do HUCAM (2013-2015)

Amostras de fezes de escolares entre 7 e 14 anos de idade (N=5.701 amostras de diferentes municípios; Quadro 1) provenientes do estudo epidemiológico para avaliação da prevalência de *Schistosoma mansoni* no estado do Espírito Santo, realizado pelo Ministério da Saúde, foram encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia do Centro de Ciências da Saúde da UFES. Dessas amostras, 1.320 (23,15%) separadas aleatoriamente (com representação de todos os municípios onde as amostras foram coletadas) e preservadas em formol a 5%, foram utilizadas para pesquisa de helmintos e protozoários intestinais pela técnica de sedimentação espontânea (HPJ) no setor de Parasitologia do Departamento de Patologia, UFES.

Amostras de fezes (N=3.611) de pacientes atendidos nos diferentes ambulatórios do HUCAM foram separadas aleatoriamente e analisadas também pela técnica de HPJ, no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital.

QUADRO 1. Municípios sorteados e incluídos no estudo epidemiológico para avaliação da prevalência de *Schistosoma mansoni* no estado do Espírito Santo, nos quais amostras de fezes de escolares entre 7 e 14 anos de idade foram coletadas e encaminhadas ao laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia, UFES, para avaliação pela técnica de Hoffman, Pons e Janer (HPJ).

Municípios	Nº amostras analisadas
Barra de São Francisco	228
Bom Jesus do Norte	25
Cachoeiro de Itapemirim	39
Domingos Martins	97
Jaguaré/Sooretama	26
Linhares	69
Marechal Floriano	164
Mimoso do Sul	15
Mucurici	20
Muniz Freire	164
Rio Bananal	120
Serra	164
Viana	33
Vila Velha	111
Vitória	45
Total	1.320

4.1.2. Amostras obtidas de pacientes atendidos no Hospital Concórdia em Santa Maria de Jetibá, ES (2012-2013)

Para avaliar a prevalência de *S. stercoralis* em alcoolistas e não alcoolistas de mesma procedência, foram coletadas amostras de fezes em Santa Maria de Jetibá, ES. Em 50 alcoolistas e 50 não alcoolistas as fezes foram examinadas pelos métodos HPJ e Baermann-Moraes. Dessa amostra de 100 pacientes foi coletado sangue periférico para detecção de anticorpos anti-*Strongyloides*. Também, alíquotas de fezes frescas foram armazenadas a -20° C.

Para avaliar melhor a prevalência do parasito no município, foram examinadas somente pelo HPJ, no mesmo período, 1.803 amostras originadas dos diferentes ambulatórios do Hospital Concórdia; hospital referência do município, sem identificação de presença ou ausência de alcoolismo.

4.1.3. Amostras obtidas de pacientes alcoolistas e não alcoolistas atendidos no Ambulatório de Atendimento a Alcoolistas e nas enfermarias do Serviço de Gastroenterologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes

Foram coletadas amostras fecais de 250 pacientes atendidos nos ambulatórios ou internados nas enfermarias do Serviço de Gastroenterologia, dos quais 132 eram alcoolistas e 118 não alcoolistas, analisadas pelos métodos Baermann-Moraes e HPJ. De um grupo desses pacientes, foi coletado sangue periférico para separação e armazenamento do soro (ver adiante) e foi coletada amostra de sangue total para análise quantitativa de linfócitos T reguladores circulantes (ver adiante). Amostras fecais frescas foram aliquotadas e armazenadas a -20 °C, de todos os pacientes.

4.1.4. Amostras utilizadas para detecção do DNA de S. stercoralis nas fezes de pacientes alcoolistas e não alcoolistas

A reação da PCR foi realizada em 127 amostras fecais de pacientes sendo 59 alcoolistas e 68 não alcoolistas provenientes das amostras do HUCAM e do Hospital Concórdia de Santa Maria de Jetibá descritas anteriormente. Todas as amostras eram de fezes frescas, e foram aliquotadas e conservadas a -20 °C até o momento da realização do teste.

4.2. Métodos coproparasitológicos utilizados

4.2.1. Sedimentação espontânea em cálice (*Hoffman, Pons e Janer*)

Uma alíquota de fezes (de 5 a 10 g) foi preparada para a sedimentação em cálice de 200 mL. A amostra foi homogeneizada com água filtrada e passada por gaze dobrada em 4 vezes para o cálice. O volume completado e o sobrenadante descartado após uma hora de sedimentação. Este processo foi repetido 2 vezes a fim de clarificar o material. Para cada sedimento, 3 lâminas (lamínula de 24 x 32 mm) foram examinadas sob microscópio ótico no mesmo dia e pelo mesmo examinador, utilizando lugol como corante (HOFFMAN *et al.*, 1934). Em uma amostra de casos as larvas eram quantificadas.

4.2.2. Método de Baermann-Moraes

Para realização da técnica de Baermann-Moraes, utilizou-se aparato específico (suporte, funil de vidro, pinça de Mohr, gaze, tubos cônicos, centrífuga) a temperatura ambiente. Para execução, o funil de vidro foi preenchido com água a 45°C. A pinça de Mohr era aberta, após o preenchimento com água, com o objetivo de deixar escorrer uma pequena quantia de água para evitar a formação de bolhas de ar na haste e no tubo de borracha. Foram colocadas de 8 a 10 g de fezes da amostra sobre uma gaze dobrada em quatro, formando-se uma pequena trouxa que foi levemente pressionada sobre uma folha de papel, achatando-se a base a fim de aumentar a superfície de contato com a água. A trouxa era posicionada sobre a superfície da água sem provocar sua imersão, objetivando formar duas zonas com temperaturas diferentes: a água a 45° e as fezes à temperatura ambiente. O conjunto era deixado em repouso durante 60 minutos e, após esse tempo, todo líquido foi coletado em tubo cônico tipo Falcon® e centrifugado a 1.500 rpm durante um minuto. O sedimento recolhido (mesmo quando não há formação de sedimento visível a olho nu) e três lâminas foram observadas a microscópio ótico com objetiva no aumento de 10x (MORAES, 1948). As larvas (rabditóides e/ou filarióides) detectadas foram quantificadas para comparação entre os grupos (alcoolistas e controles não alcoolistas).

4.3. Coleta do sangue para obtenção dos soros

Uma alíquota de 10 mL de sangue periférico foi coletada por punção venosa em tubo de coleta a vácuo (Tubo Vacutainer®) contendo EDTA no dia que o paciente trouxe a primeira amostra de fezes. Todas as amostras de sangue/soro foram testadas para HIV, Hepatites A, B e C e HTLV 1 e 2. Após coagulação, o sangue era centrifugado e o soro alíquotado e armazenado a -20 °C até sua utilização.

4.4. PCR convencional para detecção de DNA de *S. stercoralis* nas amostras de fezes

A execução da PCR foi realizada segundo protocolo descrito por Sitta e colaboradores em 2014.

Extração de DNA. O DNA foi extraído utilizando o QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit é concebido para purificação rápida de DNA total a partir de até 220 mg de fezes e é apropriado para amostras frescas e congeladas. O procedimento foi realizado com os seguintes passos: **(a)** Lise de amostras de fezes em Tampão ASL; **(b)** após lavagem, era realizada a adsorção de impurezas da amostra em coluna matriz InhibitEX; **(c)** após lavagem, era feita a purificação de DNA em colunas de centrifugação QIAamp Mini.

Primers utilizados. As sequências de DNA de *S. stercoralis* analisadas, e os iniciadores espécie-específicos utilizados, foram copiados no GenBank, com número de acesso AF279916 (Quadros 2 e 3).

QUADRO 2. Sequências oligonucleotídicas de *primers* obtidos no GenBank com número de acesso AF279916, utilizados para detecção do DNA de *Strongyloides stercoralis* nas fezes.

Primers	Sequência oligonucleotídica	Tamanho esperado do produto	Objetivo da amplificação
Stro18S-1530F	5'-GAATCCAAGTAAACGTAAGTCATTAGC-3'	101 pb	Confirmação do diagnóstico
Stro18S-1630R	5'-TGCCTCTGGATATTGCTCAGTTC-3'		
SS-F-18S-rRNA	5'- ACC GTA AAC TAT GCC TAC TAG A - 3'	244 pb	Sequenciamento
SS-R-18S-rRNA	5'- AAC CAC TAA ATC ATG AAA GAG CTA - 3'		

QUADRO 3. Sequência de bases do DNA ribossômico de *Strongyloides stercoralis* na qual estão inseridas as sequências dos *primers* (azul e vermelho) utilizadas para a PCR convencional e aquelas utilizadas para sequenciamento (verde e rosa) (Número de Acesso no GenBank: AF279916).

TNAAGATTNAGCCAAGCANGTGTAAGGACAATGTTTTAAAACATGAAACCGCGGAA
 AGCTCATTATAACAGCTATAGACTACACGGTAAATATTTTAGTTGGATAACTGAGGTA
 ATTCTTGAGCTAATACACGCTATTTATACCACATTAGTGGTGCCTTTATTTGATTAAA
 CCATTTTATATTGGTTGACTCAAATATCCTCGCTGATTTTGTTACTAAAACATACCGT
 ATGTGTATCTGGTTTATCAACTTTCGATGGTAGGGTATTGGCCTACCATGGTTGTGAC
 GGATAACGGAGAATTAGGGTTCGACTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCA
 CATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGAAAATTACCCAATTTTAGTTAAAAGAGGTTAGTG
 ACGAAAAATGACAACCAAATATTATTATTAATATTTGGATTGAAAATCTTCAAGTTTA
 AATAACTTGTTGGTAAAGGAAAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACCA
 GCTTTCCAAGTGCATAAAATGATTGTTGTGGTTAAAAGCTCGTAGTTGGATTATAAA
 GATTGTATAATGAGCATCTTGGATGTTATTTAATCATTATCATCTTATATTTTTATTAT
 ATTAGAAATAATATAATAACTGTTACTTTGAATAAATCAGAGGGTTTAAACCAGACA
 TTATATGTTTGTATGGTCTAGCATGGAATAACACTATAGAAAATTTAGTGTGGTTTC
 ACTTAATTTTTTCATGATTAATAGGAACAAACGGGGGCATTTCGTATCGCTACGTTAGAG
 GTGAAATTCTTGGACCGTAGCGAGACGTCCTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGAATGT
 TTTCAATTAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGTTGGAAGGCGATCAGATACCGCCCTAGT
 TCTAACCGTAAACTATGCCTACTAGATGTATGAATTATTAGTTATAATAATTTATG
 CATCTTCTCGGAAACGAAAGTCTTTCGGTTCGGGGGAAGTATGGTTGCAAAGC
 TGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCT
 TAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTCACCCGGGCCGACACTATAAGGATTGAC
 AGATTGATAGCTCTTTCATGATTTAGTGGTTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTC
 GTGGATATGATTTGTCTGGTTGATTCCGATAACGAGCGAGACTTTTATGTTATATTAA
 ATATTATTATTTGTTTATTTTAATATAAATAATTAATATTTTAATAACAGATTAATAG
 TGTTTAACTATTTGAGAGAGAGCGATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCGGG
 GCTGCACGCGCGCTACAATGTAGTGATCATTATGTTCCCTGTTTAGAGATAAATGGGTA
 AACATTGAAAACATTACGTAACCTGGGAATGAAAATTGCAATTATTTTTTCATGAACGA
 GGAATCCAAGTAAACGTAAGTCATTAGCTTACATTGATTACGTCCCTGCCCTTT
 GTACACACCGGCCGTCGCTGCCCGGAAGTACTGAGCAATATCCAGAGGCAAGGAGAG
 ATGTAATAAATTTTTAATTTTTTTTATATTAAATCCTTCCAATCGCTGTTGTTTGAACC
 GGGCAAAGTCGTAACAAGGTTTTTCGTAGGTGAACCTGCAGAAGGATCATCA

Execução da reação. A reação foi realizada em volume final de 25 μ L contendo: 10 mM de dNTPs, 20 pmol de cada primer, 1.5 mM de $MgCl_2$, 50 mM KCl pH 8.4, 0.5 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 100 ng de DNA extraído. Os microtubos foram inseridos no Termociclador *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific®) para realização dos ciclos: **(a)** desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; **(b)** 40 ciclos a 95 °C por 30 segundos (desnaturação), 55 °C (anelamento dos primers) por 30 segundos e **(c)** 72 °C por 30 segundos (extensão). Após o último ciclo foi realizada a extensão a 72 °C por 5 minutos. Em seguida, o produto da PCR foi aplicado em gel de agarose a 2% contendo Brometo de Etídio e submetido a eletroforese em tampão TBE (tampão Tris-Borato-EDTA). A visualização das bandas foi feita com luz ultravioleta em equipamento *Mini Bis Pro Image Analysis Systems* (DNR Bio Imaging Systems®). No mesmo gel, eram adicionadas amostra controle negativo (mix da PCR sem adição do DNA extraído das fezes) e os marcadores de tamanho do DNA (DNA Ladder, com intervalo de 50pb – Promega). O produto da PCR esperado, consistiu em um fragmento de 101 pb.

4.5. Sequenciamento do DNA

A amostra referência utilizada como padrão positivo na PCR foi purificada utilizando o QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) diretamente do tubo de PCR. O produto de PCR purificado foi submetido ao sequenciamento gênico com dois iniciadores, o *forward* SS-F-18S-rRNA (5'-ACCGTAAACTATGCCTACTAGA-3') e o *reverse* SS-R-18S-rRNA (5'-AACCACTAAATCATGAAAGAGCTA-3') separadamente, utilizando o kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems®) no sequenciador automatizado ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®) (FREITAS *et al.*, 2014). Todo procedimento de sequenciamento foi realizado no Laboratório de Virologia e Gastroenterite Infeciosa do Departamento de Patologia da UFES.

4.5.1. Edição, avaliação da qualidade e análise das sequências geradas a partir da amostra de DNA selecionada para identificação

As sequências geradas foram editadas manualmente no programa *Sequencher DNA Sequence Assembly Software 4.1.4* (Gene Codes Corporation, EUA). As sequências geradas por cada um dos iniciadores utilizados no sequenciamento de um dado fragmento de DNA foram analisadas separadamente e, em seguida, agrupadas com as demais sequências do mesmo fragmento, a fim de gerar seu *contig* ou sequência consenso. Posteriormente, as sequências foram analisadas para correção de ambiguidades. A partir de então, as sequências foram investigadas quanto a sua composição de bases.

Após edição completa dos *contigs*, estes foram submetidos ao *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (Blast), a fim de investigar a correspondência na identificação da espécie entre as sequências geradas e as sequências do banco de dados. Os critérios utilizados para a certificação da qualidade do alinhamento e interpretação correta da identificação da espécie foram: **(a)** a identidade das sequências, que representa a porcentagem de similaridade entre as sequências de DNA armazenadas no banco de dados do GenBank e **(b)** o Valor Esperado (*E-value*), que corresponde à probabilidade ao acaso da sequência em questão alinhar-se com outras sequências no banco de dados. Quanto menor o *E-value*, ou mais próximo de zero, menor a chance de o resultado do alinhamento ser consequência do acaso e, assim, mais significativo é o alinhamento dessas sequências (SCHÄFFER *et al.*, 1999).

A sequência de nucleotídeos obtida foi submetida ao GenBank (número de acesso **KX906372**).

4.6. ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Strongyloides* no soro

Foi utilizado kit comercial ELISA, que utiliza antígenos de *Strongyloides stercoralis* (AccuDiag™ *Strongyloides* IgG ELISA Kit, Diagnostic Automation/Cortez Diagnostics, Inc, California, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

O kit é utilizado para triagem de casos suspeitos de estrogiloidíase humana, para detecção de infecções crônicas assintomáticas ou latentes em áreas endêmicas e em pacientes imunocomprometidos. O kit também é utilizado para avaliação da eficácia de pacientes tratados e curados.

Segundo as informações do fabricante esse teste tem sensibilidade e especificidade de 100%. Como o kit é de fabricação americana, os resultados sobre a sensibilidade e especificidade foram provavelmente obtidos com soros de pacientes de baixo risco para helmintíases e em regiões com baixa prevalência. O kit não informa a sensibilidade e especificidade para áreas onde helmintíases são endêmicas.

A sorologia foi realizada da seguinte maneira: **(a)** as amostras de soro foram diluídas na proporção 1:64; **(b)** após incubação dos soros na placa a temperatura ambiente (15 a 25 °C) por 10 minutos, a placa foi lavada três vezes com solução de lavagem (detergente); **(c)** em seguida foram adicionados 100 µL do conjugado a cada poço; **(d)** as amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente e após isso, novamente lavadas com solução de lavagem; **(e)** foram adicionados 100 µL do cromógeno (*TMB Substrate Solution*) a cada poço e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente; por fim, foram adicionados 100 µL da solução *Stop* a cada poço, homogeneizados por 15 minutos e a leitura realizada em leitora de microplacas de ELISA (*Thermo Plate TP-READER®*).

4.7. Análise da frequência das populações de linfócitos T reguladores no sangue periférico de pacientes alcoolistas e não alcoolistas com ou sem *S. stercoralis*

Para a análise da frequência das populações de linfócitos T reguladores no sangue periférico, foram pesquisados marcadores extracelulares para os receptores CD4 e CD25 e um marcador intracelular para o fator de transcrição nuclear *foxp3*. A expressão conjunta desses marcadores (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) define a população de linfócitos T reguladores do estudo. Para verificação de ligações inespecíficas, utilizamos anticorpos murinos, específicos para imunoglobulinas de camundongo. O controle da técnica foi realizado através das definições de compensação e otimização do aparelho BD FACS Calibur (Becton Dickinson, San José, CA, EUA) a fim de retirar a interferência e sobreposição espectral dos fluorocromos utilizados.

Assim, para cada experimento, o sangue foi colhido por punção venosa num tubo de vacutainer EDTA (BD Vacutainer tube, Becton Dickison Co, Reino Unido). Para primeira etapa da fenotipagem, foram adicionados ao sangue, 0,02 mL de cada anticorpo, sendo Anti-CD4 conjugado com isotiocianato de fluoresceína e Anti-CD25 conjugado com ficoeritrina-cianina 5 (SK3 e BC96, respectivamente, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) em tubos de polipropileno, específicos para citometria de fluxo. Esses permaneciam incubados por 30 minutos a 4 °C e ao abrigo da luz. Após essa incubação, os eritrócitos foram lisados com 0,1 mL de solução de lise (BD FACS lysing solution), diluída 10 vezes, por 15 minutos em temperatura ambiente. Então, os tubos foram centrifugados a 1.400 rpm por 7 minutos e o sobrenadante descartado. A suspensão de célula obtida depois da lise foi lavada com 1 mL de PBS (*phosphate buffered saline*) gelado e centrifugada a 1.400 rpm por 7 minutos. A partir desse ponto, os tubos identificados para o controle isotópico foram suspensos em Macs Facs, onde as células permaneciam fixadas e aguardavam a leitura.

A segunda etapa da fenotipagem é intracelular e exclusiva para o fator de transcrição nuclear *foxp3*. Desta forma, aos tubos identificados para caracterização das células T reguladoras adicionava-se, 0,1 ml de solução de fixação (eBioscience IC Fixation Buffer). Essas permaneciam incubadas por 30 minutos e foram lavadas com 0,1 ml de solução de permeabilização BD (eBioscience 10x Permeabilization Buffer). O sobrenadante obtido foi descartado após uma centrifugação a 1.400 rpm por 5 minutos e as células foram suspensas em 0,1 ml de solução de permeabilização BD (ebioscience 10x Permeabilization Buffer) e 0,02 ml do anticorpo anti-*foxp3* conjugado com ficoeritrina (236A/E7). Esses permaneciam incubados por 30 minutos a 4 °C e ao abrigo da luz, foram novamente lavados com 1 mL de solução de permeabilização BD (eBioscience 10x Permeabilization Buffer), centrifugados a 1.400 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Por fim, as células foram suspensas em solução de fixação (Macs Facs-34 paraformaldeído 1%) e aguardavam 2 horas para leitura no aparelho FACScalibur (BD Biosciences). A aquisição e leitura das células foram realizadas através do programa BD CELLQUEST Pro e os resultados obtidos foram analisados pelo programa FLOWJO (TreeStar, San Carlos, CA, EUA) versão 7.6.5. A análise das

características fenotípicas da população estudada foi realizada através dos parâmetros de tamanho (FSC - *Foward Scatter*), granulosidade (SSC – *Side Scatter*) e intensidade de fluorescência dos anticorpos marcados com fluorescein isothiocyanate (FITC), *Phicoerithrin* (PE) e *Phycoerythrin-Cy5* (PE-Cy5). Foram adquiridos para essa avaliação 100.000 eventos para análise da população caracterizada como CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e 25.000 eventos para o controle isotípico da marcação celular (COVRE, 2013).

4.8. Diagnóstico do alcoolismo crônico

O diagnóstico de alcoolismo crônico foi realizado de acordo com os critérios da OMS (F10.2, ICD 10, 2002) e os pacientes foram diagnosticados com alcoolismo crônico quando sua ingestão de etanol excedeu 80 g por dia (homens) ou 40 g por dia (mulheres) por dez anos ou mais.

4.9. Análise estatística

Os dados foram armazenados no programa Microsoft Office Excel 2013, versão para Windows XP e os cálculos estatísticos foram realizados utilizando os programas EpiInfo versão 6.04, SPSS 11.5 versão para Windows e GraphPad Prisma 6. Foram utilizados testes paramétricos ou não paramétricos de acordo com a distribuição das variáveis. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4.10. Aspectos éticos

Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, Anexo I). Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do HUCAM-UFES (Protocolo número 03586812.1.0000.5071).

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da prevalência de *S. stercoralis* em amostras de escolares do estado do Espírito Santo (2011-2013) e em pacientes atendidos nos diferentes ambulatórios do HUCAM (2013-2015)

Das 1.320 amostras de escolares analisadas apenas 6 (0,45%) eram positivas para larvas de *S. stercoralis*. A prevalência dos outros parasitos intestinais, incluindo protozoários e helmintos está resumida na Tabela 1.

Das 3.611 amostras aleatórias de fezes de pacientes atendidos nos diferentes ambulatórios do HUCAM no período entre 2013 a 2015, analisadas pela técnica de sedimentação espontânea em cálice (HPJ), foram detectadas larvas de *S. stercoralis* em 42 (1,17%). A frequência dos demais parasitos intestinais na amostra está apresentada na Tabela 2.

TABELA 1. Prevalência de protozoários e helmintos em 1.320 amostras de fezes de escolares de 7 a 14 anos de idade provenientes de diferentes municípios do estado do Espírito Santo, coletadas no período entre dezembro de 2011 a março de 2013 e analisadas pela técnica de Hoffman, Pons e Janer (HPJ).

Protozoários & Helmintos	N (%; IC 95%)
Protozoários	
<i>Blastocystis hominis</i>	34 (2,57; 1,72 – 4,42)
<i>Endolimax nana</i>	107 (8,10; 6,62 – 9,47)
<i>Entamoeba coli</i>	127 (9,62; 8,00 – 11,24)
<i>Iodamoeba bustchilli</i>	2 (0,15; 0,0 – 0,36)
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	3 (0,22; 0,03 – 0,47)
<i>Giardia lamblia</i>	38 (2,87; 1,38 – 4,35)
Helmintos	
Ancilostomídeos	12 (0,90; 0,64 – 2,44)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	17 (1,28; 0,60 – 1,88)
<i>Enterobius vermicularis</i>	22 (1,66; 0,97 – 2,34)
<i>Hymenolepis nana</i>	04 (0,30; 0,07 – 0,51)
<i>Schistosoma mansoni</i>	03 (0,22; 0,03 – 0,47)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	06 (0,45; 0,08 – 0,81)
<i>Trichuris trichiura</i>	09 (0,68; 0,23 – 1,12)

TABELA 2. Prevalência de protozoários e helmintos em 3.611 amostras de fezes de pacientes atendidos nos diferentes ambulatórios do HUCAM, Espírito Santo, coletadas no período entre maio de 2013 a julho de 2015 e analisadas pela técnica de Hoffman, Pons e Janer (HPJ).

Protozoários & Helmintos	N (%; IC 95%)
Protozoários	
<i>Blastocystis hominis</i>	18 (0,50; 0,49 – 0,51)
<i>Endolimax nana</i>	211 (5,84; 5,83 – 5,85)
<i>Entamoeba coli</i>	164 (4,64; 4,63 – 4,65)
<i>Iodamoeba bustchilli</i>	02 (0,05; 0,04 – 0,06)
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	18 (0,5; 0,40 – 0,60)
<i>Giardia lamblia</i>	41 (1,13; 1,12 – 1,14)
Helmintos	
Ancilostomídeos	55 (1,52; 1,50- 1,53)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	23 (0,64; 0,63 – 0,65)
<i>Enterobius vermicularis</i>	11 (0,30; 0,20 – 0,40)
<i>Hymenolepis nana</i>	02 (0,05; 0,00 – 0,06)
<i>Schistosoma mansoni</i>	31 (0,86; 0, 85 – 0,87)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	42 (1,17; 1,16 – 1,18)
<i>Trichuris trichiura</i>	10 (0,28; 0,27 – 0,29)

5.2. Avaliação da prevalência de *S. stercoralis* em amostras de fezes de pacientes alcoolistas e controles não alcoolistas atendidos no Hospital Concórdia de Santa Maria de Jetibá – ES

Dos 50 indivíduos alcoolistas, 12 (24%) foram positivos para *S. stercoralis* com a utilização dos métodos de Baermann-Moraes e HPJ. Destes, 7 (14%) foram positivos no HPJ. Dos 50 pacientes atendidos na rotina do hospital, tomados como controle e que tiveram as amostras também analisadas pelas técnicas de HPJ e Baermann-Moraes, nenhum foi positivo para *S. stercoralis*.

Das 1.803 amostras provenientes dos diferentes ambulatórios do Hospital Concórdia e analisadas apenas pela técnica de HPJ, 21 (1,17%) foram positivas para *S. stercoralis*.

A Tabela 3 mostra os resultados relativos a pesquisa de *S. stercoralis* nos 50 alcoolistas e nos 50 controles pelos métodos de Baermann-Moraes e HPJ e das

1.803 amostras de pacientes atendidos nos diferentes serviços do Hospital Concórdia. Como pode ser observado a prevalência de *S. stercoralis* em alcoolistas é significativamente maior do que em não alcoolistas atendidos no mesmo Hospital. Se compararmos a prevalência do parasito diagnosticado pela técnica de HPJ em amostras de fezes dos 50 alcoolistas, com a prevalência observada no Hospital (N=1.803) e investigada com a mesma técnica, a prevalência é, também, significativamente maior nos alcoolistas (14 e 1,17% respectivamente; $p < 0,0005$).

TABELA 3. Prevalência de *Strongyloides stercoralis* em amostras de fezes de 50 pacientes alcoolistas, 50 não alcoolistas e 1.803 pacientes atendidos nos diferentes ambulatórios do mesmo hospital (Hospital Concórdia) e no mesmo período, entre maio de 2013 a julho de 2015, no município de Santa Maria de Jetibá, ES. As amostras foram analisadas pelas técnicas de Baermann-Moraes (BM) e Hoffman, Pons e Janer (HPJ).

GRUPOS	<i>S. stercoralis</i>			
	BM (+) N (%) IC 95%	BM (-) N (%) IC 95%	HPJ (+) N (%) IC 95%	HPJ (-) N (%) IC 95%
Alcoolistas (N=50)	12 (24) 12,1 – 35,4	38 (76) 52,1 – 79,0	7 (14) 4,3 – 23,3	43 (86) 76,3 – 95,6
Não Alcoolistas (N=50)	0,0 (0,0) -	50 (100) -	0,0 (0,0) -	50 (100) -
Ambulatórios ^a (N=1.803)	NR -	NR -	21 (1,17) 0,67 – 1,66	1.782 (98,83) 97,7 – 98,9

^aPacientes atendidos nos diferentes ambulatórios do Hospital. Alcoolistas versus não alcoolistas, método de Baermann-Moraes ou HPJ: $p < 0,01$; alcoolistas método HPJ versus pacientes atendidos no ambulatório, método HPJ, $p < 0,001$.

5.3. Avaliação da prevalência de *S. stercoralis* em pacientes atendidos no serviço de Gastroenterologia do HUCAM

Amostras de fezes de 241 pacientes atendidos no Serviço de Gastroenterologia do HUCAM foram analisadas pelas técnicas de HPJ e Baermann-Moraes (Tabela 4). A frequência do exame positivo foi significativamente maior nos pacientes alcoolistas, embora com valor de p próximo ao limite da significância.

TABELA 4. Prevalência de *Strongyloides stercoralis*, diagnosticado por Hoffman, Pons e Janer e Baermann-Moraes, em amostras de fezes de pacientes alcoolistas (N=125) e controles não alcoolistas (N=116), atendidos no setor de Gastroenterologia do Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes, Vitória, ES.

GRUPOS	<i>S. stercoralis</i>		Valor de p
	Positivo N (%; IC 95%)	Negativo N (%; IC 95%)	
Alcoolistas (N=125)	19 (15,2%; 13,1 – 17,3)	106 (84,8%; 78,5 – 91,1)	<0,05
Controles (N=116)	9 (7,7%; 2,8 – 12,5)	107 (92,3%; 87,4 – 97,1)	

5.4. Avaliação da pesquisa de anticorpos anti-*S. stercoralis* (IgG) no soro, utilizando ELISA com antígenos de larvas L3 de *S. stercoralis*

A pesquisa de anticorpos (IgG) anti-*Strongyloides* foi realizada em 148 amostras de soros de pacientes alcoolistas (N=77) e não alcoolistas (N=71). Em 139 havia o resultado da pesquisa de larvas nas fezes. A frequência de sorologia foi significativamente maior nos alcoolistas (Tabela 5).

TABELA 5. Resultado do teste ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Strongyloides* (IgG) em amostras de soros de pacientes alcoolistas (N=77) e controles não alcoolistas (N=71).

GRUPOS	ELISA		Valor de p*
	Positivo N (%; IC95%)	Negativo N (%; IC95%)	
Alcoolistas (N=77)	25 (32,4%; 29,5 – 35,2)	52 (67,6%; 57,1 – 78,1)	<0,05
Não alcoolistas (N=71)	8 (11,2%; 4,1 – 18,2)	63 (88,8%; 81,7 – 95,8)	

Comparação estatisticamente significativa (p<0,05) de acordo com teste Exato de Fischer.

Nos 139 casos com amostras pareadas de fezes e soro, a comparação dos resultados da sorologia nos casos positivos ou negativos para *S. stercoralis*, independente do uso abusivo do etanol, mostrou sensibilidade de 72,7% (IC 95%: 54,1 – 91,3) e especificidade de 86,3% (IC 95%: 80,1 – 92,5). O índice kappa foi de 0,499 (Tabela 6). Os resultados mostraram que, embora a sensibilidade tenha sido razoável, o índice de concordância foi considerado moderado.

TABELA 6. Resultado do teste ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Strongyloides* (IgG) em soros de pacientes com presença (*Strongyloides* +) ou ausência (*Strongyloides* -) de larvas de *Strongyloides stercoralis*, detectadas pelo exame parasitológico de fezes.

SOROLOGIA	EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES		TOTAL
	<i>Strongyloides</i> (+)	<i>Strongyloides</i> (-)	
Positiva	16	16	32
Negativa	6	101	107
TOTAL	22	117	139

Índice kappa=0,499 (IC 95%: 0,320 – 0,677). Força de concordância moderada.

A distribuição dos resultados da sorologia de acordo com densidade óptica observada no ELISA está representada na Figuras 3. Como pode ser observado a frequência de resultados positivos com densidades ópticas acima de 0,500 é maior no grupo de alcoolistas (2/8 no grupo não alcoolista e 12/25 nos alcoolistas).

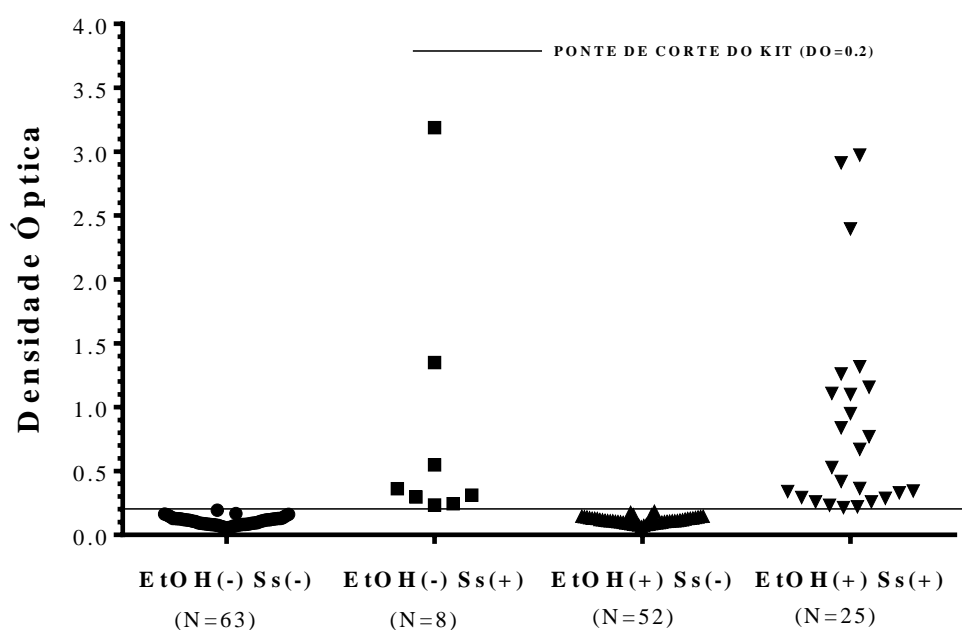


FIGURA 3. Distribuição das densidades ópticas do ELISA para *Strongyloides stercoralis* em pacientes alcoolistas (N=77) e não alcoolistas (N=71), com exame parasitológico positivo ou negativo para o parasito. EtOH(-) Ss(-): não alcoolistas, *S. stercoralis* negativos; EtOH(+) Ss(-): alcoolistas, positivos para *S. stercoralis*; EtOH(-) Ss(+): não alcoolistas, positivos para *S. stercoralis*; EtOH(+) Ss(+): alcoolistas, positivos para *S. stercoralis*.

5.5. Diagnóstico de *S. stercoralis* por PCR convencional em amostras de fezes de pacientes alcoolistas e não alcoolistas

Os resultados da PCR convencional, realizada em amostras de fezes de 125 pacientes (57 alcoolistas e 68 não alcoolistas) estão resumidos na Tabela 7. Como pode ser observado, resultado de PCR positivo foi significativamente mais frequente nos pacientes alcoolistas.

Na Tabela 8 estão os resultados da PCR em relação ao resultado do exame parasitológico de fezes. Como pode ser observado, a sensibilidade do PCR foi de 93,3% (IC95%: 80,6 – 100,0) e a especificidade foi de 100%, considerando o exame parasitológico como padrão ouro.

Os resultados com a PCR confirmam a maior prevalência do parasito em alcoolistas do que em não alcoolistas.

TABELA 7. Comparação dos resultados da PCR convencional para o diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* em amostras de fezes de pacientes alcoolistas (N=57) e controles não alcoolistas (N=68).

GRUPOS	PCR	
	<i>S. stercoralis</i> (+) N (%; IC95%)	<i>S. stercoralis</i> (-) N (%; IC95%)
Alcoolistas (N=57)	10 (17,5%; 7,6 – 27,3)	47 (82,5%; 72,3 – 92,3)
Não alcoolistas (N=68)	4 (5,9%; 0,3 – 11,5)	64 (94,1%; 88,4 – 99,7)

Teste Exato de Fischer: $p < 0,05$.

TABELA 8. Resultado do teste PCR convencional para o diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* em amostras de fezes de pacientes alcoolistas e controles não alcoolistas, com presença (*Strongyloides* +) ou ausência (*Strongyloides* -) de larvas de *S. stercoralis*, detectadas pelo exame parasitológico de fezes.

PCR	EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES		TOTAL
	<i>Strongyloides</i> (+)	<i>Strongyloides</i> (-)	
<i>Strongyloides</i> (+)	14	0	14
<i>Strongyloides</i> (-)	1	110	111
TOTAL	15	110	125

Índice kappa=0,961 (IC 95%: 0,884 – 1,000). Força de concordância quase perfeita.

5.6. Número de larvas eliminadas nas fezes de pacientes alcoolistas crônicos e controles não alcoolistas

A análise quantitativa do número de larvas nos exames coproparasitológicos foi realizada em amostras de fezes de 15 pacientes alcoolistas e 10 controles não alcoolistas. Os resultados estão dispostos na Figura 4. A mediana do número de larvas observadas foi significativamente maior nos alcoolistas (respectivamente, 290 e 9 em 13 alcoolistas e 10 controles pela técnica de Baermann-Moraes, $p < 0,05$; 30 e 1 em 15 alcoolistas e 9 controles no HPJ, $p < 0,05$). A Figura 4 mostra o gráfico de dispersão das larvas contadas pelos dois métodos coproparasitológicos utilizados, demonstrando que, no HPJ, método usado de rotina, é raro o achado de mais de uma larva no grupo controle, enquanto que, em amostras de alcoolistas, mesmo utilizando a técnica de HPJ, o achado de grande quantidade de larvas é comum. É interessante ressaltar que, em amostras de fezes de dois alcoolistas, nas quais o número de larvas detectadas pela técnica de HPJ foi muito baixo (uma larva), os pacientes estavam em abstinência alcoólica por mais de um ano.

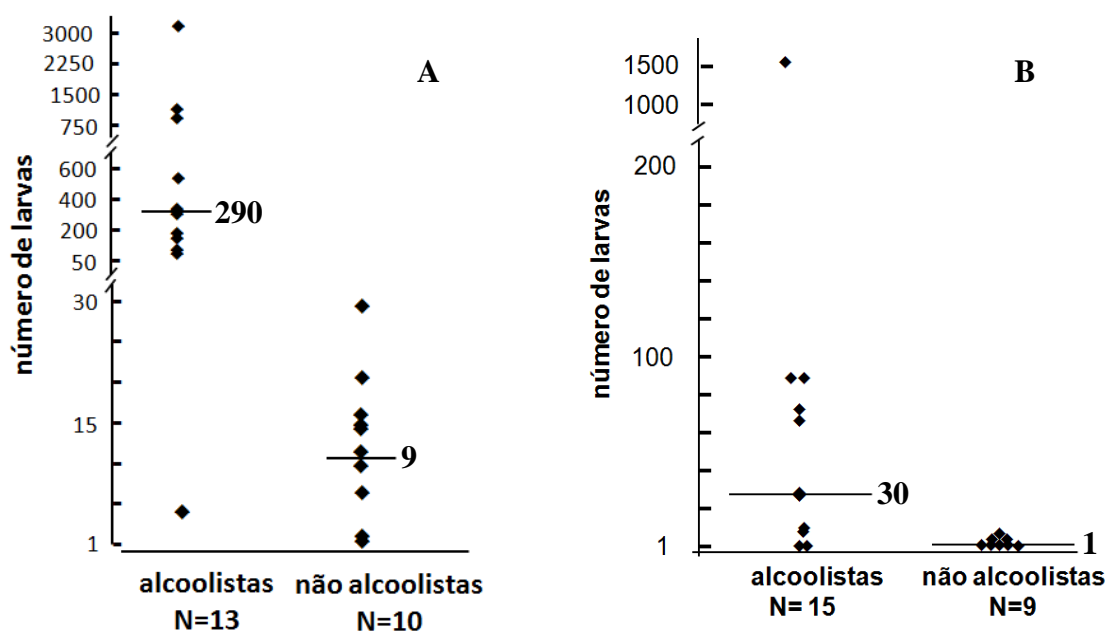


FIGURA 4. Distribuição do número de larvas detectadas em cada exame coproparasitológico em alcoolistas e não alcoolistas. Em A, pelo método de Baermann-Moraes e em B, pelo Hoffman, Pons e Janer (HPJ).

5.7. Avaliação da população de linfócitos T reguladores no sangue periférico de pacientes alcoolistas e controles não alcoolistas, positivos ou não para *S. stercoralis*

Para avaliação quantitativa da população de linfócitos T reguladores ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) no sangue periférico, foram utilizadas 19 amostras de sangue de pacientes alcoolistas e 17 amostras de pacientes controles não alcoolistas, atendidos no HUCAM. Os resultados estão resumidos na Figura 5.

Como pode ser observado, a frequência de linfócitos Treg no grupo de alcoolistas sem *Strongyloides*, não alcoolistas com *Strongyloides* e nos alcoolistas com *Strongyloides*, foi significativamente maior do que no grupo controle (não alcoolista, negativos para *Strongyloides*). No entanto, a frequência de linfócitos T reguladores no grupo de alcoolistas com *Strongyloides* não diferiu significativamente do grupo não alcoolista com *Strongyloides* ou do grupo de alcoolistas sem *Strongyloides*.

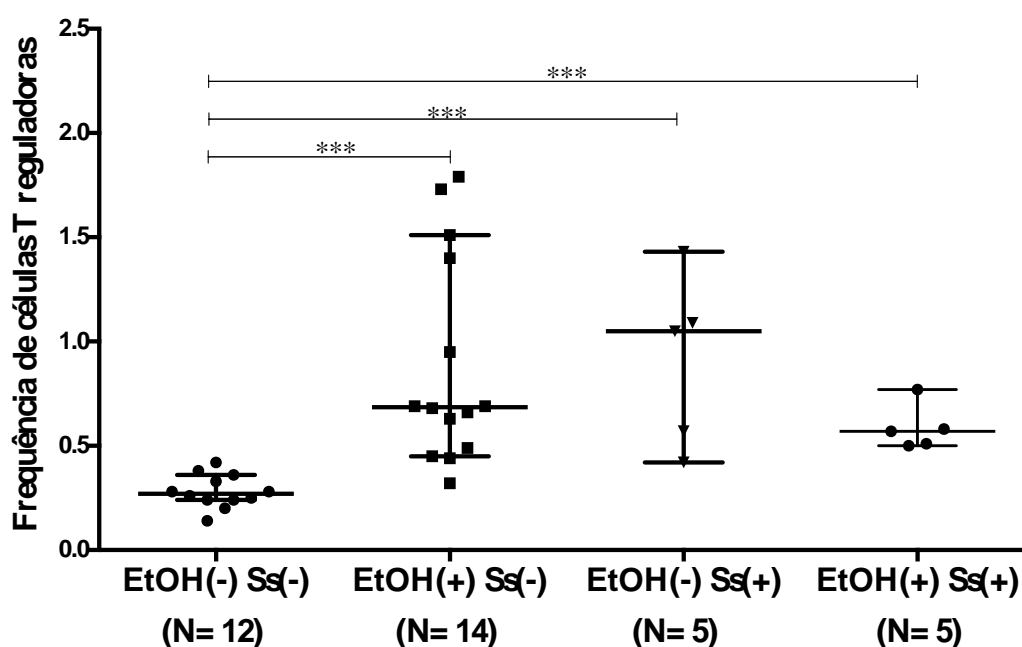


FIGURA 5. Frequência de células T reguladoras no sangue periférico de pacientes alcoolistas e controles não alcoolistas, com ou sem infecção com *Strongyloides stercoralis*. EtOH(-) Ss(-): grupo não alcoolista, negativos para *S. stercoralis*; EtOH(+) Ss(-): grupo alcoolista, positivo para *S. stercoralis*; EtOH(-) Ss(+): grupo não alcoolista, positivo para *S. stercoralis*; EtOH(+) Ss(+): grupo alcoolista, positivo para *S. stercoralis*. *** p <0,0005.

6. DISCUSSÃO

6.1. Análise da prevalência de *S. stercoralis* em escolares (7 a 14 anos de idade) no estado do Espírito Santo e em pacientes atendidos na rotina do HUCAM

Os resultados do exame coproparasitológico por sedimentação espontânea em amostras aleatórias de fezes de escolares entre 7 e 14 anos de idade de todo o estado (0,45%) e em pacientes atendidos na rotina do HUCAM e no Hospital Concórdia em Santa Maria de Jetibá (ambas 1,17%) mostraram que a prevalência da infecção com *S. stercoralis* no estado está nos valores que o classificam como área endêmica para o parasito, segundo Pires e Dreyer (1993). De acordo com esses autores, *S. stercoralis* é considerado parasito esporádico se a prevalência é menor do que 1%, endêmico quando maior do que 1 e menor do 5% e hiperendêmico quando acima de 5%. Esses autores consideraram resultados obtidos com métodos coproparasitológicos convencionais e não específicos para larvas de helmintos, utilizados na rotina de laboratórios de análises clínicas. É possível que com a utilização de métodos específicos para detecção de larvas, a prevalência observada no estado seja maior do a observada nas amostras aqui estudadas, embora a diferença não deva ser superior a 100%, já que a utilização do método de Baermann-Moraes melhora a sensibilidade do diagnóstico em torno de 60% em relação aos métodos de sedimentação (SUKHAVAT *et al.*, 1994; SATO *et al.*, 1995; STEINMANN *et al.*, 2007; KNOPP *et al.*, 2008).

Em uma revisão sobre prevalência de *S. stercoralis* no Brasil (PAULA e COSTA-CRUZ, 2011) os autores publicam uma tabela com dados mais recentes que mostram prevalência muito variável nas diferentes regiões do país. Nessa tabela, o Espírito Santo aparece classificado como infecção esporádica, com base em dados obtidos em um estudo em Cachoeiro de Itapemirim (CASTRO *et al.*, 2004) no qual foi investigado o parasito nas fezes de escolares de 8 a 15 anos de idade, utilizando a técnica de HPJ. A prevalência encontrada (0,47%) foi semelhante a observada na amostra mais abrangente para o estado aqui relatada (0,45%). Portanto, embora as prevalências baixas sejam subestimadas devido aos métodos empregados na detecção do parasito, elas devem refletir a prevalência real do parasito nesse grupo etário, considerando o tamanho e a representatividade da amostra analisada. A amostra de escolares não é a melhor para avaliar a prevalência do parasito no estado,

já que a prevalência de *S. stercoralis* aumenta com a idade nas quatro primeiras décadas da vida (MINÉ e ROSA, 2008). Dessa forma, a prevalência observada em escolares subestima a prevalência na população em geral.

As amostras de pacientes atendidos no HUCAM e no Hospital Concórdia são de adultos, e podem ser consideradas representativas da população que usa o sistema único de saúde (SUS), incluindo, na sua maioria, pessoas de renda familiar média/baixa. Portanto, as prevalências encontradas nessas duas amostras, muito semelhantes, permitem admitir que o estado pode ser considerado endêmico para o *S. stercoralis*, com prevalência menor do que a média de 5,5% relatada por Paula e Costa-Cruz (2011) para o Brasil.

Uma análise da publicação de Zago-Gomes e colaboradores (2002) e Marques e colaboradores (2010), que utilizaram levantamento dos exames parasitológicos realizados no Laboratório de Análises Clínicas do HUCAM no período entre 2000 e 2003 para avaliar a prevalência do *S. stercoralis* em alcoolistas crônicos, mostra que a prevalência observada nessa época foi maior do que a que está relatada na presente pesquisa (4,1% e 1,17%, respectivamente), indicando que tem havido uma redução na ocorrência do parasito entre os pacientes atendidos no hospital. Essa aparente redução na prevalência de *S. stercoralis* se justifica pela mudança de perfil de atendimento do Hospital Universitário, que teve grande redução no atendimento ambulatorial, com redução também nas internações. Além disso, houve redução mais acentuada de pacientes de consulta primária, que passaram a ser atendidos nos serviços de saúde dos municípios vizinhos de Vitória. Essa redução na prevalência de *S. stercoralis* acompanha a redução acentuada na prevalência de helmintíases intestinais no nosso meio decorrente da melhoria das condições sanitárias, de educação e de atenção a saúde.

6.2. Análise da prevalência de *S. stercoralis* em alcoolistas e não alcoolistas oriundos do município de Santa Maria de Jetibá, ES e atendidos no setor de Gastroenterologia do HUCAM

Os resultados observados na amostra de alcoolistas atendidos no Hospital Concórdia, em Santa Maria do Jetibá (ES), confirmam as observações anteriores de

maior prevalência do parasito nesses pacientes do que em não alcoolistas ou na população em geral atendida no mesmo Hospital. Esse dado confirma a maior prevalência do parasito em alcoolistas crônicos, mesmo quando a observação é feita em um Hospital que atende uma população mais homogênea, composta dos habitantes da cidade e dos distritos rurais vizinhos a essa cidade. Nos estudos realizados em Uberlândia (OLIVEIRA *et al.*, 2002) e em Vitória (Zago-Gomes *et al.*, 2002) os controles não eram absolutamente pareados aos casos, mas eram tomados entre os pacientes atendidos nos diferentes setores do Hospital.

A influência do grupo controle é muito importante quando analisamos a prevalência de *S. stercoralis* em alcoolistas, observada em uma amostra colhida de pacientes atendidos no Serviço de Gastroenterologia do HUCAM, onde a probabilidade de encontrarmos pacientes positivos para *Strongyloides* é muito maior do que se tomarmos uma amostra de pacientes atendidos em todos os ambulatórios do Hospital. Mesmo nessa amostra, na qual os controles mostraram prevalência maior do parasito do que a dos pacientes originados de todos os ambulatórios e enfermarias do hospital, a prevalência em alcoolistas foi significativamente maior, embora com nível de significância menor do que observado quando se usa a prevalência geral do hospital como prevalência controle. O grupo controle dos serviços de Gastroenterologia inclui pacientes com queixas gastrointestinais e com hepatopatias crônicas, que representam fatores que podem estar associados á infecção com *S. stercoralis* (GABURRI *et al.*, 1997).

6.3. Pesquisa de anticorpos anti-*Strongyloides* (IgG) no soro de pacientes alcoolistas e controles não alcoolistas, utilizando ELISA com antígenos de larvas L3 de *S. stercoralis*

Os resultados mostraram que há uma maior prevalência de sorologias positivas nos pacientes alcoolistas do que nos não alcoolistas. Essa é a primeira observação que mostra maior prevalência de sorologia positiva para *S. stercoralis* em alcoolistas crônicos, confirmando, assim, as observações feitas por Oliveira e colaboradores (2002) e Zago-Gomes e colaboradores (2002) que mostraram maior frequência de exames parasitológicos positivos para *S. stercoralis* em alcoolistas crônicos.

Quando analisamos a distribuição das densidades ópticas nos alcoolistas e não alcoolistas com a sorologia positiva, as densidades mais elevadas (acima de 0,600) foram mais frequentes nos alcoolistas. Isso pode representar a maior prevalência do parasito nesse grupo, mas também pode ser consequência de parasitismo mais intenso, como foi demonstrado pelo maior número de larvas detectadas nas fezes. No entanto não foi possível detectar uma relação entre a densidade óptica no ELISA e a carga parasitária, pelo número pequeno de casos analisados.

A detecção de anticorpos anti-*Strongyloides* com o método utilizado, comparado com o exame parasitológico de fezes, embora tenha mostrado boa sensibilidade, teve índice kappa de concordância moderada. Há duas razões para essa menor concordância: **(a)** a presença de anticorpos circulantes pode representar presença do parasito ou cicatriz sorológica que permanece após a eliminação do parasito, **(b)** reação cruzada com outros parasitos intestinais. O teste empregado, segundo o fabricante, tem alta sensibilidade e especificidade, indicadas como 100%. No entanto, não informa como esse teste foi validado, ou seja, se as amostras negativas utilizadas foram de pessoas que vivem em zonas onde as helmintíases são endêmicas ou não. Portanto, podemos admitir que o teste utilizado resulte em reações falso-positivas devido a reação cruzada com outros enteroparasitos. No entanto, é muito difícil inferir reação cruzada no paciente que: **(a)** tem outro parasito, **(b)** PCR negativo para *Strongyloides* e **(c)** tem sorologia positiva para *Strongyloides*, porque não temos como investigar se esse paciente teve uma infecção passada com *Strongyloides*. De qualquer modo, o teste empregado pode ser utilizado como teste para rastrear casos positivos nos quais se fará a pesquisa de larvas nas fezes, conforme sugerem vários autores (CARROLL *et al.*, 1981; BIGGS *et al.*, 2009; MARCOS *et al.*, 2011; LEVENHAGEN e COSTA-CRUZ, 2014).

6.4. Pesquisa do DNA de *Strongyloides stercoralis* nas fezes de pacientes alcoolistas e não alcoolistas

Os resultados obtidos com a PCR mostraram que há maior prevalência de exames positivos para *S. stercoralis* em amostras de pacientes alcoolistas do que em não alcoolistas, confirmando, assim, o que foi observado com a utilização de outros

métodos para identificar o parasito. Apesar de não ser considerada padrão ouro para o diagnóstico da estrogiloidíase, a técnica de PCR tem sido relatada como técnica de altas sensibilidade (entre 85 e 100%) e especificidade (100%) (VERWEIJ *et al.*, 2009; KRAMME, 2010; AHMAD *et al.*, 2013; KNOPP *et al.*, 2014; SITTA *et al.*, 2014), razão pela qual ela seria importante para detectar, especialmente no grupo de não alcoolistas, casos com poucas larvas eliminadas nas fezes. A sensibilidade da PCR nesse material foi de 93,3%, o que está de acordo com observações de outros autores que não encontraram sensibilidade de 100% (VERWEIJ *et al.*, 2009; KNOPP *et al.*, 2014; SITTA *et al.*, 2014). Pode-se inferir que os casos negativos na PCR tenham sido casos falsos positivos no exame parasitológico. Na amostra aqui estudada a pesquisa de larvas nas fezes foi rigorosa, com dois métodos, razão pela qual admite-se que casos falsos positivos (identificação incorreta da larva) no exame parasitológico devem ter sido pouco frequentes. Além disso, na amostra aqui estudada o caso que foi falso negativo na PCR teve identificação de larvas nos dois métodos e tinha sorologia positiva com densidade óptica três vezes acima do ponto de corte. É possível que o resultado não esperado da PCR tenha sido decorrente de problemas no armazenamento da amostra alíquotada ou na execução da técnica. Foi impossível identificar se houve problema na colheita e armazenamento da amostra e em uma repetição da PCR com o mesmo material – o resultado continuou negativo.

6.5. Análise da população de linfócitos T reguladores no sangue periférico de pacientes alcoolistas e controles não alcoolistas, positivos ou não para *S. stercoralis*

Nossos resultados demonstraram que a frequência de células Treg no sangue periférico de pacientes alcoolistas crônicos foi significativamente maior do que em pacientes não alcoolistas quando ambos os grupos não estavam infectados por *S. stercoralis*. Esses resultados diferiram daqueles reportados em pacientes com hepatite alcoólica (ALMEIDA *et al.*, 2013) e em pacientes com cirrose alcoólica descompensada (KASZTELAN-SZCZARBINSKA *et al.*, 2015).

Em pacientes com doença hepática alcoólica, a resposta imune é mais inflamatória, resultando em um aumento da atividade de Th17 (KASZTELAN-SZCZARBINSKA

et al., 2015), o que induz maior lesão hepática. Na verdade, em pacientes alcoolistas sem doença hepática, como reportado por Almeida e colaboradores (2013), a frequência de células Treg demonstrou uma tendência clara de aumento; achado similar foi reportado em pacientes cirróticos por Kasztelan-Szczerbinska e colaboradores (2015). Redução significativa de células Treg foi observada em pacientes com formas mais severas dessas doenças. Os pacientes alcoolistas arrolados nesse estudo não tinham evidências clínicas ou laboratoriais de doença hepática. Dessa forma, sugere-se que o uso abusivo de etanol pode induzir o aumento de células Treg, o que pode reduzir o efeito potencialmente nocivo do etanol sobre o fígado, reduzindo, assim, a resposta inflamatória no fígado, como mostrado em pacientes com hepatites alcóolicas (ALMEIDA *et al.*, 2013) e cirrose hepática descompensada (KASZTELAN-SZCZEBINSKA *et al.*, 2015).

O aumento da frequência de células Treg não tem sido reportado em humanos infectados com *S. stercoralis*, na ausência de outros fatores associados. Os resultados apresentados nesse estudo demonstraram que maior frequência de células Treg foram observadas em pacientes não alcoolistas infectados com *Strongyloides*. É possível que, como observado em outros helmintos em humanos e modelos experimentais (WAMMES *et al.*, 2012; BLANKENHAUS *et al.*, 2014), os linfócitos Treg também participem dos mecanismos de facilitação da sobrevivência de *Strongyloides* no duodeno. O aumento da frequência de células Treg observadas em alcoolistas sem doença hepática pode ser um fator que promove a sobrevivência de *S. stercoralis* nesses pacientes, como foi identificado em pacientes nos quais a infecção com o parasito estava associada com a infecção pelo HTLV-1 (MONTES *et al.*, 2009). No entanto, as frequências de células Treg em pacientes alcoolistas e infectados com *Strongyloides*, embora significativamente maiores do que nos pacientes do grupo controle, não diferiram significativamente de pacientes alcoolistas sem *S. stercoralis* ou de pacientes não alcoolistas infectados com *S. stercoralis*. Adicionalmente, ao contrário dos pacientes não alcoolistas infectados com *S. stercoralis*, observou-se uma tendência decrescente nas frequências de células Treg em pacientes alcoolistas e infectados com *S. stercoralis*. Assim, o etanol não pareceu induzir o aumento de células Treg no grupo de pacientes alcoolistas infectados com *S. stercoralis*. A ausência de evidências que apoiem um

possível efeito estimulante do etanol nas frequências de células Treg detectadas em pacientes alcoolistas infectados com *S. stercoralis* pode estar relacionada ao fato de que, neste grupo, todos os pacientes tinham doença hepática compensada, enquanto que os pacientes alcoolistas sem *S. stercoralis* não apresentavam sinais de doença hepática. O agravamento da doença hepática é acompanhado por uma redução na frequência de células Treg no sangue circulante de pacientes com hepatite (ALMEIDA *et al.*, 2013) e cirrose hepática descompensada (KASZTELAN-SZCZERBINSKA *et al.*, 2015).

6.6. Considerações finais

Os resultados mostrados nas diferentes amostras estudadas demonstram que o Espírito Santo pode ser considerado área endêmica para *S. stercoralis*, baseado na prevalência observada em duas grandes amostras de pacientes atendidos em dois hospitais gerais, um na capital (Vitória) e outro no interior (Santa Maria de Jetibá).

Os resultados observados nas diferentes amostras de alcoolistas e não alcoolistas, confirmaram que a prevalência do parasito é sempre significativamente maior em alcoolistas do que em não alcoolistas, independentemente do método utilizado para identificar o parasito. Constatou-se, também, que mesmo quando a amostra controle (não alcoolista) foi originada de pacientes atendidos em um serviço de Gastroenterologia, onde se espera maior prevalência do parasito, a prevalência de *S. stercoralis* foi maior nos pacientes alcoolistas.

Uma observação constatada foi a de que o número de larvas eliminadas pelos alcoolistas é frequentemente maior do que em não alcoolistas. Essa informação é importante, pois, mesmo se admitirmos que a maior prevalência do parasito relatada em alcoolistas possa não ser real (os grupos controles não foram pareados adequadamente), a observação mostrou que o alcoolista elimina mais larvas. Isso indica que pacientes alcoolistas têm maior número de fêmeas no duodeno ou as fêmeas existentes têm maior fecundidade. Inclusive, é possível que a flutuação na eliminação de larvas, com períodos de eliminação mínima, seja menor.

A possibilidade de que a prevalência de *Strongyloides* em alcoolistas seja realmente maior pode ser decorrência dos hábitos de higiene dos pacientes, o que favorece a infecção externa ou a autoinfestação externa. Por outro lado, pode-se admitir, também, que a maior frequência de exames parasitológicos observados nos alcoolistas sejam consequência do maior número de larvas eliminadas por esses pacientes, facilitando o diagnóstico parasitológico, mesmo em métodos rotineiros de sedimentação espontânea. Desse modo é mais fácil diagnosticar o parasito em alcoolistas do que em não alcoolistas. Em não alcoolistas, a possibilidade de eliminação menor de larvas e de flutuação na eliminação de larvas é maior, facilitando resultados falsos negativos.

Quanto aos possíveis mecanismos relacionados com o aumento da eliminação de larvas nos alcoolistas, eles são, ainda, muito obscuros. Várias hipóteses têm sido propostas pelos autores que relataram maior prevalência de *S. stercoralis* em alcoolistas do que em não alcoolistas atendidos no mesmo hospital. Marques e colaboradores (2010), Oliveira e colaboradores (2002), Zago-Gomes e colaboradores (2002) discutiram alguns possíveis mecanismos, especialmente ligados à imunossupressão induzida pelo etanol e aos precários hábitos de higiene que podem estar relacionados com o etilismo crônico. Além desses mecanismos, Marques (2010) e Zago-Gomes (2002) discutem outros possíveis fatores, entre os quais: **(a)** o álcool induz imunossupressão que favoreceria a instalação e sobrevivência do parasito; no entanto os mesmos autores questionam esse mecanismo, pois, o etilismo crônico induz redução da resposta Th1 com manutenção ou até exacerbação da Th2, o que aumentaria a resistência ao parasito; portanto a supressão ou redução da resposta imunitária responsável pela resistência ao parasito não parece um mecanismo evidente. Como será discutido adiante, um desequilíbrio da resposta imunitária poderia estar envolvido; **(b)** o etanol altera a resposta imunitária inata especialmente a função de neutrófilos, os quais são importantes na resistência às larvas, principalmente no pulmão o que favoreceria a instalação de maior número de fêmeas no duodeno. Essa hipótese é plausível porque as observações experimentais (BRELOER e ABRAHAM, 2016) mostram a importância da imunidade inata na resistência às larvas L3 e é bem conhecido que o alcoolismo altera a função de neutrófilos e macrófagos, reduzindo o seu poder

microbicida, especialmente nas intoxicações agudas. É comum que etilistas tenham períodos de ingestão intensa e, nesses períodos e embriagados, estariam mais expostos às larvas (higiene) e a resistência às mesmas estaria diminuída, com aumento da chance de infecção (MESSINGHAM *et al.*, 2002; PASALA *et al.*, 2015; SZABO e SAHA, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2016); **(c)** o etanol diminui a motilidade intestinal, o que favoreceria a maior permanência das larvas rabditóides na luz intestinal, com maturação para larvas filarióides infectantes e a autoinfecção; de fato há algumas observações que mostram redução da motilidade intestinal em alcoolistas crônicos (WEGENER *et al.*, 1991; ADDOLORATO *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2016), mas essa alteração não parece ser muito evidenciada nesses pacientes. **(d)** O etanol aumenta a liberação de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), aumentando a produção de corticoides (SILVA *et al.*, 2016), e altera o metabolismo destes esteroides, podendo gerar metabólitos com função ecdisona similar, favorecendo a muda das larvas e a fecundidade das fêmeas (as ecdisonas são os hormônios que controlam o desenvolvimento das larvas do parasito). Essa é uma hipótese proposta por Genta (1992) para explicar a alta frequência de estrogiloidíase disseminada em pacientes tratados com corticoides. No entanto é uma hipótese que precisa ser melhor testada, especialmente pela avaliação de metabólitos ecdisona similar em alcoolistas. Por fim, **(e)** o uso abusivo do etanol pode alterar a resposta imunitária, criando um ambiente que altere e favoreça a diferenciação de larvas filarióides, aumentando assim a chance de autoinfecção; haveria uma alteração em relação às respostas aos antígenos do parasito, criando uma desregulação imunitária, que não seria uma imunossupressão simples, mas um desequilíbrio entre as respostas que induzem resistência e as que facilitam a sobrevivência do parasito. Essa hipótese é baseada na observação de Viney e colaboradores (2004), que demonstraram em cultura de fezes de pacientes HIV positivos e infectados com *S. stercoralis* que a diferenciação das larvas rabditóides para formas de vida livre ou para larvas filarióides infectantes se relacionou com o número de linfócitos T CD4⁺: quanto menor esse número, maior a frequência de diferenciação de formas de vida livre, havendo, portanto, menor diferenciação de larvas infectantes, o que reduz a chance de autoinfecção. Essa influência da resposta imunitária na diferenciação de larva rabditóides em filarióides infectantes ou de vida livre é reforçada por observações experimentais com *S. ratti* (HARVEY *et al.*,

2000). Nestes experimentos, ratos com imunossupressão (atímicos ou ratos convencionais tratados com cortisona), ratos previamente infectados com uma, dez ou cinquenta larvas (ratos previamente sensibilizados) e ratos controles, foram infectados com larvas L3 infectantes e as fezes cultivadas em diferentes dias para avaliação da evolução das larvas rhabditóides em filarióides infectas (L3i) ou machos e fêmeas de vida livre. Os resultados mostraram que nos animais previamente sensibilizados houve aumento da diferenciação para machos e fêmeas de vida livre e, nos imunossuprimidos, houve redução significativa dessa diferenciação. Os autores concluíram que um fator endógeno importante na determinação da diferenciação das larvas de *S. ratti* é a resposta imunitária do hospedeiro aos antígenos do parasito. Os resultados de Viney e colaboradores (2004) mostram que a redução da imunidade celular favoreceu a diferenciação de formas de vida livre, resultado aparentemente oposto ao observado experimentalmente por Harvey e colaboradores (2000). No entanto, nesses estudos foram avaliadas duas espécies diferentes, que podem diferir na resposta das larvas às respostas imunitárias do hospedeiro frente aos antígenos do parasito. Pode-se admitir, também, que no modelo experimental e na AIDS, ambos com imunossupressão, pode existir uma desregulação imunitária semelhante, ou seja, a relação entre as diferentes respostas do hospedeiro (Th1, Th2, Th17 e Treg) possa ser parecida. Uma investigação mais detalhada não é fácil de ser feita porque o modelo experimental mais próximo da infecção humana com *S. stercoralis* é a infecção em cães.

Dos mecanismos acima discutidos acreditamos que a hipótese de desregulação da resposta imunitária, induzida pelo etanol, deve ser um mecanismo importante na sobrevivência do parasito, no aumento da fecundidade das fêmeas e na maior frequência de diferenciação das larvas L3 infectantes ainda no tubo digestivo nos alcoolistas crônicos, aumentando a chance de autoinfecção e de encontro de larvas nas fezes desses pacientes.

7. CONCLUSÃO

Os resultados permitiram concluir que:

1. O estado do Espírito Santo pode ser considerado uma região endêmica para *S. stercoralis*.
2. Houve maior prevalência de *S. stercoralis* em amostras de fezes de alcoolistas do que não alcoolistas, seja por métodos coproparasitológicos, seja pela detecção de DNA do parasito nas fezes pela PCR.
3. Houve maior prevalência de sorologias positivas para *S. stercoralis* em alcoolistas do que em não alcoolistas, confirmando que a infecção com o parasito nestes pacientes é mais frequente.
4. Houve maior número de larvas eliminadas nas fezes de alcoolistas do que em não alcoolistas, sugerindo maior carga parasitária ou maior fecundidade das fêmeas.
5. Em alcoolistas crônicos, sem manifestações evidentes de hepatopatia, há maior frequência de linfócitos T reguladores no sangue circulante.
6. Nos pacientes infectados com *S. stercoralis*, alcoolistas ou não, houve aumento de linfócitos T reguladores no sangue periférico, mas o uso abusivo do etanol não foi um fator potencializador desse aumento nos alcoolistas.

8. PROPOSIÇÕES FUTURAS

1. Pesquisar IgA secretora anti-*S. stercoralis* na saliva e nas fezes de alcoolistas e não alcoolistas infectados com *S. stercoralis* (e em amostras de respectivos controles). Como a IgA secretora é importante na resistência contra parasitos intestinais, o etanol pode interferir na sua excreção.
2. Avaliar a evolução de larvas rabaditóides fecais de *S. stercoralis* de indivíduos alcoolistas e não alcoolistas em meio de cultura para comparar a frequência de diferenciação de machos e fêmeas de vida livre nos dois grupos. Com isso, poderemos inferir se há algum mecanismo interferindo na diferenciação das larvas.
3. Avaliar quantitativamente a produção de IL-5 em cultura de sangue total, de alcoolistas crônicos com e sem *S. stercoralis*, após estimulação com antígeno solúvel de *S. stercoralis*, para verificar se há relação dos níveis séricos dessa citocina com a prevalência do parasito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham D, Rotman HL, Haberstroh HF, Yutanawiboonchai W, Brigandi RA, Leon O, Nolan TJ, Schad GA. *Strongyloides stercoralis*: protective immunity to third-stage larvae in BALB/cByJ mice. **Exp Parasitol**. 1995; 80(2):297-307.

Addolorato G, Montalto M, Capristo E, Certo M, Fedeli G, Gentiloni N, Stefanini GF, Gasbarrini G. Influence of alcohol on gastrointestinal motility: lactulose breath hydrogen testing in orocecal transit time in chronic alcoholics, social drinkers and teetotaler subjects. **Hepatogastroenterology**. 1997; 44(16):1076-81.

Adedayo O, Grell G, Bellot P. Hyperinfective strongyloidiasis in the medical ward: review of 27 cases in 5 years. **South Med J**. 2002; 95(7):711-6.

Ahmad AF, Hadip F, Ngui R, Lim YA, Mahmud R. Serological and molecular detection of *Strongyloides stercoralis* infection among an Orang Asli community in Malaysia. **Parasitol Res**. 2013; 112(8):2811-6.

Almeida J, Polvorosa MA, Gonzalez-Quintela A, Marcos M, Pastor I, Hernandez Cerceño ML, Orfao A, Laso FJ. Decreased peripheral blood CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells in patients with alcoholic hepatitis. **Alcohol Clin Exp Res**. 2013; 37(8):1361-9.

Anuradha R, Munisankar S, Bhootra Y, Jagannathan J, Dolla C, Kumaran P, Shen K, Nutman TB, Babu S. Systemic Cytokine Profiles in *Strongyloides stercoralis* Infection and Alterations following Treatment. **Infect Immun**. 2015(a); 84(2):425-31.

Anuradha R, Munisankar S, Dolla C, Kumaran P, Nutman TB, Babu S. Parasite Antigen-Specific Regulation of Th1, Th2, and Th17 Responses in *Strongyloides stercoralis* Infection. **J Immunol**. 2015(b); 195(5):2241-50.

Avendaño L, Hernandez F, Jimenez F, Avila A, Castro D. *Strongyloides stercoralis* em pacientes alcohólicos. **Prasitol Dia**. 1999; 23:1-6.

Baermann G. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden). In: Larven in Erdproben. Neded Geneesk Laborat Weltever Feestbundel. 1917: 41-47.

Basuni M, Muhi J, Othman N, Verweij JJ, Ahmad M, Miswan N, Rahumatullah A, Aziz FA, Zainudin NS, Noordin R. A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. **Am J Trop Med Hyg.** 2011; 84(2):338-43.

Becker SL, Chatigre JK, Gohou JP, Coulibaly JT, Leuppi R, Polman K, Chappuis F, Mertens P, Herrmann M, N'Goran EK, Utzinger J, von Müller L. Combined stool-based multiplex PCR and microscopy for enhanced pathogen detection in patients with persistent diarrhoea and asymptomatic controls from Côte d'Ivoire. **Clin Microbiol Infect.** 2015; 21(6):591.e1-10.

Biggs BA, Caruana S, Mhrshahi S, Jolley D, Leydon J, Chea L, Nuon S. Management of chronic strongyloidiasis in immigrants and refugees: is serologic testing useful? **Am J Trop Med Hyg.** 2009; 80(5):788-91.

Blankenhaus B, Reitz M, Brenz Y, Eschbach ML, Hartmann W, Haben I, Sparwasser T, Huehn J, Kühl A, Feyerabend TB, Rodewald HR, Breloer M. Foxp3⁺ regulatory T cells delay expulsion of intestinal nematodes by suppression of IL-9-driven mast cell activation in BALB/c but not in C57BL/6 mice. **PLoS Pathog.** 2014 Feb 6;10(2):e1003913.

Brannon MJ, Faust EC. Preparation and testing of a specific antigen for diagnosis of human strongyloidiasis. **Am J Trop Med Hyg.** 1949; 29(2):229-39.

Breloer M, Abraham D. *Strongyloides* infection in rodents: immune response and immune regulation. **Parasitology.** 2016; 24:1-21. [Epub ahead of print]

Buonfrate D, Angheben A, Gobbi F, Muñoz J, Requena-Mendez A, Gotuzzo E, Mena MA, Bisoffi Z. Imported strongyloidiasis: epidemiology, presentations, and treatment. **Curr Infect Dis Rep.** 2012; 14(3):256-62.

- Campo-Polanco L, Gutiérrez LA, Cardona Arias J. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: meta-analysis on evaluation of conventional parasitological methods (1980-2013). **Rev Esp Salud Publica**. 2014; 88(5):581-600.
- Campos DMB e Ferreira MS. Estrongiloidíase. In: **Cimerman. Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1999. Cap. 39. p.287-300.
- Carroll SM, Karthigasu KT, Grove DI. Serodiagnosis of human strongyloidiasis by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 1981; 75(5):706-9.
- Castro AZ, Viana JDC, Penedo AA, Donatele DM. Levantamento das Parasitoses Intestinais em Escolares da Rede Pública na Cidade de Cachoeiro de Itapemirim – ES. **News Lab**. 2004; 63:102-5.
- Conway DJ, Bailey JW, Lindo JF, Robinson RD, Bundy DA, Bianco AE. Serum IgG reactivity with 41-, 31-, and 28-kDa larval proteins of *Strongyloides stercoralis* in individuals with strongyloidiasis. **J Infect Dis**. 1993; 168(3):784-7.
- Conway DJ, Lindo JF, Robinson RD, Bundy DA, Bianco AE. *Strongyloides stercoralis*: characterization of immunodiagnostic larval antigens. **Exp Parasitol**. 1994; 79(2):99-105.
- Costa-Cruz JM, Bullamah CB, Gonçalves-Pires Mdo R, Campos DM, Vieira MA. Cryo-microtome sections of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 1997; 39(6):313-7.
- Costa-Cruz JM, Madalena J, Silva DA, Sopelete MC, Campos DM, Taketomi EA. Heterologous antigen extract in ELISA for the detection of human IgE anti-*Strongyloides stercoralis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 2003; 45(5):265-8.
- Covre LP. Avaliação do papel de receptores tipo *Toll* 2 e 4 na resposta imune de indivíduos sadios, reativos ou não ao teste tuberculínico, frente ao desafio *in vitro*

com *Mycobacterium tuberculosis*. 2013. Mestrado em Doenças Infecciosas), Universidade Federal do Espírito Santo, ES.

Dada-Adegbola HO, Bakare RA. Strongyloidiasis in children five years and below. **West Afr J Med**. 2004; 23(3):194-7.

De Carli GA. **Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. 2 Ed. São Paulo: Atheneu, 2007, 906p.

De Paula FM, de Castro E, Gonçalves-Pires Md, Marçal Md, Campos DM, Costa-Cruz JM. Parasitological and immunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 2000; 42(1):51-5.

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

Dreyer G, Fernandes-Silva E, Alves S, Rocha A, Albuquerque R, Addiss D. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: implications for diagnosis and clinical trials. **J Clin Microbiol**. 1996; 34(10):2569-71.

El-Badry AA. ELISA-based coproantigen in human strongyloidiasis: a diagnostic method correlating with worm burden. **J Egypt Soc Parasitol**. 2009; 39(3):757-68.

Formenti F, Buonfrate D, Prandi R, Marquez M, Caicedo C, Rizzi E, Guevara AG, Vicuña Y, Huerlo FR, Perandin F, Bisoffi Z, Anselmi M5. Comparison of *S. stercoralis* Serology Performed on Dried Blood Spots and on Conventional Serum Samples. **Front Microbiol**. 2016; 7:1778.

Freitas LB, Chen Z, Muqui EF, Boldrini NA, Miranda AE, Spano LC, Burk RD. Human papillomavirus 16 non-European variants are preferentially associated with high-grade cervical lesions. **PLoS One**. 2014; 9(7):e100746.

- Gaburri D, Gaburri AK, Hubner E, Lopes MH, Ribeiro AM, de Paulo GA, Pace FH, Gaburri PD, Ornellas AT, Ferreira JO, Chebli JM, Ferreira LE, de Souza AF. Intestinal parasitosis and hepatic cirrhosis. **Arq Gastroenterol**. 1997; 34(1):7-12.
- Gam AA, Neva FA, Krotoski WA. Comparative sensitivity and specificity of ELISA and IHA for serodiagnosis of strongyloidiasis with larval antigens. **Am J Trop Med Hyg**. 1987; 37(1):157-61.
- Genta RM. Dysregulation of strongyloidiasis: a new hypothesis. **Clin Microbiol Rev**. 1992; 5(4):345-55.
- Genta RM. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into the prevention of disseminated disease. **Rev Infect Dis**. 1989; 11(5):755-67.
- Genta RM, Schad GA, Hellman ME. *Strongyloides stercoralis*: parasitological, immunological and pathological observations in immunosuppressed dogs. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 1986; 80(1):34-41.
- Genta RM, Weil GJ. Antibodies to *Strongyloides stercoralis* larval surface antigens in chronic strongyloidiasis. **Lab Invest**. 1982; 47(1):87-90.
- Gill GV, Bell DR. *Strongyloides stercoralis* infection in former Far East prisoners of war. **Br Med J**. 1979; 2(6190):572-4.
- Gonçalves FL. *Strongyloides stercoralis* e infecção pelo HIV: prevalência em pacientes HIV positivos em Vitória, ES, e revisão sistemática dos casos de estrogiloidíase grave em pacientes com HIV/AIDS. 2011. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas), Universidade Federal do Espírito Santo, ES.
- Greaves D, Coggle S, Pollard C, Aliyu SH, Moore EM. *Strongyloides stercoralis* infection. **BMJ**. 2013; 30;347:f4610.
- Greiner K, Bettencourt J, Semolic C. Strongyloidiasis: a review and update by case example. **Clin Lab Sci**. 2008 Spring;21(2):82-8.

- Grove DI. Human Strongyloidiasis. **Advances in Parasitology**. 1996; v.38, p.251-309.
- Grove DI. Strongyloidiasis in Allied ex-prisoners of war in south-east Asia. **Br Med J**. 1980; 280(6214):598-601.
- Grove DI, Blair AJ. Diagnosis of human strongyloidiasis by immunofluorescence, using *Strongyloides ratti* and *S. stercoralis* larvae. **Am J Trop Med Hyg**. 1981; 30(2):344-9.
- Harvey SC, Gemmill AW, Read AF, Viney ME. The control of morph development in the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. **Proc Biol Sci**. 2000; 267(1457):2057-63.
- Hays R, Esterman A, McDermott R. Type 2 Diabetes Mellitus Is Associated with *Strongyloides stercoralis* Treatment Failure in Australian Aboriginals. **PLoS Negl Trop Dis**. 2015; 9(8):e0003976.
- Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. Sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. Puerto Rico. **J Publ Hlth**. 1934; 9: 283-298.
- Huaman MC, Sato Y, Aguilar JL, Terashima A, Guerra H, Gotuzzo E, Kanbara H. Gelatin particle indirect agglutination and enzymelinked immunosorbent assay for diagnosis of strongyloidiasis using *Strongyloides venezuelensis* antigen. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 2003; 97:535-8.
- Incarni RN, Ferrer E, Hoek D, Ramak R, Roelfsema J, Mughini-Gras L, Kortbeek T, Pinelli E. Diagnosis of intestinal parasites in a rural community of Venezuela: Advantages and disadvantages of using microscopy or RT-PCR. **Acta Trop**. 2016; 167:64-70. [Epub ahead of print].
- Kasztelan-Szczerbińska B, Surdacka A, Celiński K, Roliński J, Zwolak A, Miącz S, Szczerbiński M. Prognostic Significance of the Systemic Inflammatory and Immune Balance in Alcoholic Liver Disease with a Focus on Gender-Related Differences. **PLoS One**. 2015; 10(6):e0128347.

Keiser PB, Nutman TB. *Strongyloides stercoralis* in the Immunocompromised Population. **Clin Microbiol Rev.** 2004; 17(1):208-17.

Knopp S, Mgeni AF, Khamis IS, Steinmann P, Stothard JR, Rollinson D, Marti H, Utzinger J. Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques. **PLoS Negl Trop Dis.** 2008; 2(11):e331.

Knopp S, Salim N, Schindler T, Karagiannis Voules DA, Rothen J, Lweno O, Mohammed AS, Singo R, Benninghoff M, Nsojo AA, Genton B, Daubenberger C. Diagnostic Accuracy of Kato-Katz, FLOTAC, Baermann, and PCR Methods for the Detection of Light-Intensity Hookworm and *Strongyloides stercoralis* Infections in Tanzania. **Am J Trop Med Hyg.** 2014; 90(3): 535-545.

Kramme S, Nissen N, Soblik H, Erttmann K, Tannich E, Fleischer B, Panning M, Brattig N. Novel real-time PCR for the universal detection of *Strongyloides* species. **J Med Microbiol.** 2011; 60(Pt 4):454-8.

Lam CS, Tong MK, Chan KM, Siu YP. Disseminated strongyloidiasis: a retrospective study of clinical course and outcome. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2006; 25(1):14-8.

Levenhagen MA, Costa-Cruz JM. Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. **Acta Trop.** 2014; 135:33-43.

Liu LX, Weller PF. *Strongyloidiasis* and other intestinal nematode infections. **Infect Dis Clin North Am.** 1993; 7(3):655-82.

Llewellyn S, Inpankaew T, Nery SV, Gray DJ, Verweij JJ, Clements AC, Gomes SJ, Traub R, McCarthy JS. Application of a Multiplex Quantitative PCR to Assess Prevalence and Intensity Of Intestinal Parasite Infections in a Controlled Clinical Trial. **PLoS Negl Trop Dis.** 2016; 10(1):e0004380.

Marcos LA, Terashima A, Canales M, Gotuzzo E. Update on strongyloidiasis in the immunocompromised host. **Curr Infect Dis Rep.** 2011; 13(1):35-46.

- Marques CC, da Penha Zago-Gomes M, Gonçalves CS, Pereira FE. Alcoholism and *Strongyloides stercoralis*: daily ethanol ingestion has a positive correlation with the frequency of *Strongyloides* larvae in the stools. **PLoS Negl Trop Dis**. 2010; 22; 4(6):717.
- Messingham KA, Faunce DE, Kovacs EJ. Alcohol, injury, and cellular immunity. *Alcohol*. **Alcohol**. 2002; 28(3):137-49.
- Miné JC, Rosa JA. Frequency of *Blastocystis hominis* and other intestinal parasites in stool samples examined at the Parasitology Laboratory of the School of Pharmaceutical Sciences at the São Paulo State University, Araraquara. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2008; 41(6):565-9.
- Montes M, Sanchez C, Verdonck K, Lake JE, Gonzalez E, Lopez G, Terashima A, Nolan T, Lewis DE, Gotuzzo E, White AC Jr. Regulatory T cell expansion in HTLV-1 and strongyloidiasis co-infection is associated with reduced IL-5 responses to *Strongyloides stercoralis* antigen. **PLoS Negl Trop Dis**. 2009; 9;3(6):456.
- Montes M, Sawhney C, Barros N. *Strongyloides stercoralis*: there but not seen. **Curr Opin Infect Dis**. 2010; 23(5):500-4.
- Moraes RG. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidose no Brasil. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**. 1948; 1:507-624.
- Mota-Ferreira DM, Gonçalves-Pires MR, Júnior AF, Soplete MC, Abdallah VO, Costa-Cruz JM. Specific IgA and IgG antibodies in paired serum and breast milk samples in human strongyloidiasis. **Acta Trop**. 2009; 109(2):103–7.
- Neva FA. Biology and immunology of human strongyloidiasis. **J Infect Dis**. 1986; 153(3):397-406.
- Neva FA, Gam AA, Maxwell C, Pelletier LL. Skin test antigens for immediate hypersensitivity prepared from infective larvae of *Strongyloides stercoralis*. **Am J Trop Med Hyg**. 2001; 65(5):567-72.
- Neves DP. **Parasitologia Dinâmica**. 3 ed., São Paulo: Atheneu, 2009.

- Nguyen T, Cheong FW, Liew JW, Lau YL. Seroprevalence of fascioliasis, toxocariasis, strongyloidiasis and cysticercosis in blood samples diagnosed in Medic Medical Center Laboratory, Ho Chi Minh City, Vietnam in 2012. **Parasit Vectors**. 2016; 9(1):486.
- Nolan TJ, Bhopale VM, Schad GA. Hyperinfective strongyloidiasis: *Strongyloides stercoralis* undergoes an autoinfective burst in neonatal gerbils. **J Parasitol**. 1999; 85(2):286-9.
- Nolan TJ, Genta RM e Schad GA. “Strongyloidosis”. **In:Palmer SR. Zoonoses. Biology, Clinical Practices, and Public Health Control**. Oxford: Oxford University Press. 1998; 747-56.
- Nolan TJ, Megyeri Z, Bhopale VM, Schd GA. *Strongyloides stercoralis*: the first rodent model for uncomplicated and hyperinfective strongyloidiasis, the Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*). **J Infec Dis**. 1993; 168:1479-84.
- Nutman TB. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. **Parasitology**. 2016; 16:1-11. [Epub ahead of print]
- Oliveira LC, Ribeiro CT, Mendes DM, Oliveira TC, Costa-Cruz JM. Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2002; 97(1):119-21.
- Pasala S, Barr T, Messaoudi I. Impact of Alcohol Abuse on the Adaptive Immune System. **Alcohol Res**. 2015;37(2):185-97.
- Paula FM, Costa-Cruz JM. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. **Parasitology**. 2011; 138(11):1331-40.
- Paula FM, Malta FM, Corral MA, Marques PD, Gottardi M, Meisel DM, Yamashiro J, Pinho JR, Castilho VL, Gonçalves EM, Gryschek RC, Chieffi PP. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection in immunocompromised patients by serological and molecular methods. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 2016; 58:63.

Pessoa SB. Superfamília Rhabdiasoidea-*Strongyloides stercoralis* e estrogiloidose. In: **Pessoa. Parasitologia Médica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978. cap. 40, p. 569-80.

Pires ML, Dreyer G. Revendo a importancia do *Strongyloides stercoralis*. **Rev Hosp Clin Fac Med Univ São Paulo**. 1993; 48(4):175-82.

Pocaterra LA, Ferrara G, Peñaranda R, Rojas E, Pérez-Chacón G, Hernán A, Certad G, Goldstein C, Núñez L. Improved Detection of *Strongyloides stercoralis* in Modified Agar Plate Cultures. **Am J Trop Med Hyg**. 2017. doi: 10.4269/ajtmh.16-0414. [Epub ahead of print]

Prendki V, Fenaux P, Durand R, Thellier M, Bouchaud O. Strongyloidiasis in man 75 years after initial exposure. **Emerg Infect Dis**. 2011; 17(5):931-2.

Requena-Méndez A, Chiodini P, Bisoffi Z, Buonfrate D, Gotuzzo E, Muñoz J. The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. **PLoS Negl Trop Dis**. 2013; 7(1):e2002.

Ribeiro VS, Feliciano ND, Gonzaga HT, Costa IN, Gonçalves-Pires MR, Ueta MT, Costa-Cruz JM. Detergent fraction of heterologous antigen to detect IgA and IgG in strongyloidiasis using saliva and serum paired samples. **Immunol Lett**. 2010; 134(1):69-74.

Rodrigues RM, de Oliveira MC, Sopelete MC, Silva DA, Campos DM, Taketomi EA, Costa-Cruz JM. IgG1, IgG4, and IgE antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen. **Parasitol Res**. 2007; 101(5):1209-14.

Safdar A, Malathum K, Rodriguez SJ, Husni R, Rolston KV. Strongyloidiasis in patients at a comprehensive cancer center in the United States. **Cancer**. 2004; 100(7):1531-6.

Salazar SA, Gutierrez C, Berk SL. Value of the agar plate method for the diagnosis of intestinal strongyloidiasis. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 1995; 23(4):141-5.

Sato Y, Kobayashi J, Toma H, Shiroma Y. Efficacy of stool examination for detection of *Strongyloides* infection. **Am J Trop Med Hyg.** 1995; 53(3):248-50.

Sato Y, Toma H, Kiyuna S, Shiroma Y. Gelatin particle indirect agglutination test for mass examination for strongyloidiasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1991; 85(4):515-8.

Schad GA, Aikens LM, Smith G. *Strongyloides stercoralis*: is there a canonical migratory route through the host? **J Parasitol.** 1989; 75(5):740-9.

Schad GA, Hellman ME, Muncey DW. *Strongyloides stercoralis*: hyperinfection in immunosuppressed dogs. **Exp Parasitol.** 1984; 57(3):287-96.

Schad GA, Smith G, Megyeri Z, Bhopale VM, Niamatali S, Maze R. *Strongyloides stercoralis*: an initial autoinfective burst amplifies primary infection. **Am J Trop Med Hyg.** 1993; 48:716-25.

Schäffer AA, Wolf YI, Ponting CP, Koonin EV, Aravind L, Altschul SF. IMPALA: matching a protein sequence against a collection of PSI-BLAST-constructed position-specific score matrices. **Bioinformatics.** 1999; 15(12):1000-11.

Siddiqui AA, Berk SL. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clin Infect Dis.** 2001; 33(7):1040-7.

Silva ML, Inês Ede J, Souza AB, Dias VM, Guimarães CM, Menezes ER, Barbosa LG, Alves Mdel C, Teixeira MC, Soares NM. Association between *Strongyloides stercoralis* infection and cortisol secretion in alcoholic patients. **Acta Trop.** 2016; 154:133-8.

Silva LP, Barcelos IS, Passos-Lima AB, Espindola FS, Campos DM, Costa-Cruz JM. Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2003; 98(5):687-91.

Silva CV, Ferreira MS, Borges AS, Costa-Cruz JM. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients: experience at a teaching hospital in central Brazil. **Scand J Infect Dis.** 2005; 37(3):211-5.

- Sithithaworn J, Sithithaworn P, Janrungsopa T, Suvatanadecha K, Ando K, Haswell-Elkins MR. Comparative assessment of the gelatin particle agglutination test and an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of strongyloidiasis. **J Clin Microbiol.** 2005; 43(7):3278-82.
- Sitta RB, Malta FM, Pinho JR, Chieffi PP, Gryscek RC, Paula FM. Conventional PCR for molecular diagnosis of human strongyloidiasis. **Parasitology.** 2014; 141(5): 716-721.
- Steinmann P, Zhou XN, Du ZW, Jiang JY, Wang LB, Wang XZ, Li LH, Marti H, Utzinger J. Occurrence of *Strongyloides stercoralis* in Yunnan Province, China, and comparison of diagnostic methods. **PLoS Negl Trop Dis.** 2007; 1(1):e75.
- Sukhavat K, Morakote N, Chaiwong P, Piangjai S. Comparative efficacy of four methods for the detection of *Strongyloides stercoralis* in human stool specimens. **Ann Trop Med Parasitol.** 1994; 88(1):95-6.
- Sykes AM, McCarthy JS. A coproantigen diagnostic test for *Strongyloides* infection. **PLoS Negl Trop Dis.** 2011; 5(2):e955.
- Szabo G, Saha B. Alcohol's Effect on Host Defense. **Alcohol Res.** 2015; 37(2):159-70.
- Teixeira MC, Inês EJ, Pacheco FT, Silva RK, Mendes AV, Adorno EV, Lima FM, Soares NM. Asymptomatic *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in an alcoholic patient with intense anemia. **J Parasitol.** 2010; 96(4):833-5.
- Teixeira MC, Pacheco FT, Souza JN, Silva ML, Inês EJ, Soares NM. *Strongyloides stercoralis* Infection in Alcoholic Patients. **Biomed Res Int.** 2016; 4872473.
- Uparanukraw P, Phongsri S, Morakote N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. **Am J Trop Med Hyg.** 1999; 60(6):967-73.
- Verweij JJ, Canales M, Polman K, Ziem J, Brienens EA, Polderman AM, van Lieshout L. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 2009; 103(4):342-6.

Viney ME, Brown M, Omoding NE, Bailey JW, Gardner MP, Roberts E, Morgan D, Elliott AM, Whitworth JA. Why does HIV infection not lead to disseminated strongyloidiasis? **J Infect Dis.** 2004; 190(12):2175-80.

Wammes LJ, Hamid F, Wiria AE, Wibowo H, Sartono E, Maizels RM, Smits HH, Supali T, Yazdanbakhsh M. Regulatory T cells in human lymphatic filariasis: stronger functional activity in microfilareemics. **PLoS Negl Trop Dis.** 2012; 6(5):e1655.

Wegener M, Schaffstein J, Dilger U, Coenen C, Wedmann B, Schmidt G. Gastrointestinal transit of solid-liquid meal in chronic alcoholics. **Dig Dis Sci.** 1991; 36(7):917-23.

Zago-Gomes MP, Aikawa KF, Perazzio SF, Gonçalves CS, Pereira FE. Prevalence of intestinal nematodes in alcoholic patients. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2002; 35(6):571-4.

ANEXOS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO: “Alcoolismo e *Strongyloides stercoralis*: investigação de possíveis fatores associados à maior prevalência do nematóide em alcoolistas crônicos”.

Entidade executora: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Coordenador: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira (27) 3335-7210

Doutorando: Steveen Rios Ribeiro

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa sobre um parasito intestinal denominado *Strongyloides stercoralis*, que pode produzir doença.

Para identificar o parasito, você coletará suas fezes, sem conservante, para serem examinadas e receberá o resultado desse exame. Também serão coletados 10 ml de sangue e 5 ml de saliva, por profissionais, seguindo todas as normas de biossegurança.

A sua participação não envolve nenhum risco para a sua saúde.

A sua participação voluntária não lhe dará nenhum privilégio, seja ela de caráter financeiro ou de qualquer natureza. Serão garantidos o sigilo e privacidade dos dados, e você poderá abandonar o projeto em qualquer momento, sem nenhuma penalização ou prejuízo. Qualquer dúvida entrar em contato com o coordenador do projeto.

Confirmo ter conhecimento do conteúdo deste termo. A minha assinatura abaixo indica que concordo em participar desta pesquisa e por isso dou meu consentimento.

Nome legível: _____

Data de Nascimento: ____ / ____ / ____

Assinatura:

<i>Strongyloides stercoralis</i>																			
GRUPO DE PACIENTES ALCOOLISTAS E CONTROLES NÃO ALCOOLISTAS ATENDIDOS NO HUCAM (VITÓRIA) E NO HOSPITAL CONCÓRDIA (SANTA MARIA DE JETIBÁ), ES																			
ALCOOLISTAS	Nº Registro	Iniciais	Situação	Idade	Sexo	Nº Amostras	Fezes Aliq	Soro Aliq	EPF + Hel	EPF + S.s	HPJ	Média Larvas/HPJ	BM	Média Larvas/BM	Citometria	Sorologia	Sorol/DO	PCR -1	HTLV 1/2
1	A1	MMC	AH	70	1	1	1	1	0	1	1	++	1	++	NR	1	0,950	1	0
2	A2	WHA	AH	53	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0,329	0	0
3	A3	EPR	AH	50	1	0	0	1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1	0	0,089	NR	0
4	A4	SCO	AH	50	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0,213	0	0
5	A5	AGP	AH	53	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0,085	0	0
6	A6	JBT	AH	65	1	0	0	1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1	0	0,116	NR	0
7	A7	CAVP	AH	45	1	2	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0,105	0	0
8	A8	JBBS	AH	48	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0,292	0	0
9	A9	JR	AH	49	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0,258	0	0
10	A10	AC	AH	56	1	1	1	1	0	1	1	90	1	3300	1	1	1,259	1	0
11	A11	LLGB	AH	29	0	0	0	1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1	0	0,145	NR	0
12	A12	LCAS	AH	52	1	1	1	1	0	0	NR	NR	1	0	1	0	0,107	0	0
13	A13	ES	AH	47	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0,178	0	0
14	A14	VS	AH	46	1	0	0	1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1	1	0,220	NR	0
15	A15	JDPN	AH	50	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0,124	NR	0
16	A16	DL	AH	54	1	1	1	1	Anci	0	1	0	1	0	1	1	0,233	0	0
17	A17	JEH	AH	47	1	1	0	1	0	0	1	0	NR	NR	1	1	0,287	NR	0
18	A18	AJD	AH	72	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0,159	0	0
19	A19	VMB	AH	47	1	0	0	1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0	0,074	NR	0
20	A20	MCP	AH	46	1	1	1	1	0	1	1	1500	NR	NR	1	1	2,395	1	0
21	A21	NJSR	AH	33	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0,064	0	0
22	A22	GCV	AH	43	1	1	0	1	0	0	1	0	NR	NR	1	0	0,147	NR	0
23	A23	AFV	AH	63	1	0	0	1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0	0,119	NR	0
24	A24	OP	AH	63	1	0	0	1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1	0	0,186	NR	0

ALCOOLISTAS	Nº Registro	Iniciais	Situação	Idade	Sexo	Nº Amostras	Fezes Aliq	Soro Aliq	EPF + Hel	EPF + S.s	HPJ	Média Larvas/HPJ	BM	Média Larvas/BM	Citometria	Sorologia	Sorol/DO	PCR -1	HTLV 1/2
25	A25	MRSM	AH	54	0	1	1	1	0	0	1	0	NR	NR	1	0	0,140	0	0
26	A26	PRR	AH	44	1	1	1	1	0	1	1	5	NR	NR	1	1	2,974	1	0
27	A27	JP	AH	40	1	1	0	1	0	1	1	NR	NR	NR	1	1	1,316	NR	0
28	A28	LCJ	AH	51	0	1	1	1	0	1	1	114	NR	NR	1	0	0,119	1	0
29	A29	JAS	AH	54	1	1	1	0	0	1	1	11	1	290	NR	NR	NR	1	NR
30	A-SMJ 1	MAP	ASMJ	40	1	3	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,101	0	0
31	A-SMJ 2	AL	ASMJ	40	1	2	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,137	0	0
32	A-SMJ 3	DD	ASMJ	43	1	2	1	1	Anci	0	1	0	1	0	NR	0	0,111	0	0
33	A-SMJ 4	DR	ASMJ	28	1	2	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,159	0	0
34	A-SMJ 5	GM	ASMJ	35	1	2	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,097	0	0
35	A-SMJ 6	LS	ASMJ	38	0	3	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,092	0	0
36	A-SMJ 7	IM	ASMJ	32	0	1	1	1	Anci	1	1	+	1	0	NR	0	0,133	0	0
37	A-SMJ 8	LFR	ASMJ	32	0	3	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,128	0	0
38	A-SMJ 9	RAM	ASMJ	42	1	3	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,079	0	0
39	A-SMJ 10	JB	ASMJ	32	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,141	0	0
40	A-SMJ 11	MJLS	ASMJ	38	1	3	1	1	Anci	0	1	0	1	0	NR	0	0,112	0	0
41	A-SMJ 12	LFPM	ASMJ	48	1	3	1	1	0	1	1	+	1	+	NR	1	0,419	1	0
42	A-SMJ 13	BS	ASMJ	43	1	3	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,107	0	0
43	A-SMJ 14	FMW	ASMJ	45	1	3	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,108	0	1
44	A-SMJ 15	DD	ASMJ	41	0	3	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,120	0	0
45	A-SMJ 16	JPS	ASMJ	51	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	1	0,259	0	0
46	A-SMJ 17	AT	ASMJ	53	1	3	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,085	0	0
47	A-SMJ 18	ZS	ASMJ	46	1	3	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,142	0	0
48	A-SMJ 19	AV	ASMJ	51	1	3	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,094	0	0
49	A-SMJ 20	EW	ASMJ	50	1	3	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,104	0	0
50	A-SMJ 21	WK	ASMJ	74	1	3	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,115	0	0
51	A-SMJ 22	CBL	ASMJ	38	0	3	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,110	0	0
52	A-SMJ 23	IL	ASMJ	38	1	1	1	1	0	1	1	0	1	+	NR	0	0,128	0	0

ALCOOLISTAS	Nº Registro	Iniciais	Situação	Idade	Sexo	Nº Amostras	Fezes Alíq	Soro Alíq	EPF + Hel	EPF + S.s	HPJ	Média Larvas/HPJ	BM	Média Larvas/BM	Citometria	Sorologia	Sorol/DO	PCR -1	HTLV 1/2
53	A-SMJ 24	FP	ASMJ	60	1	1	1	1	0	1	1	+	1	+	NR	1	2,912	1	0
54	A-SMJ 25	VH	ASMJ	42	1	1	1	1	0	1	1	0	1	+	NR	1	0,770	0	0
55	A-SMJ 26	JH	ASMJ	49	1	1	0	1	0	1	1	0	1	+	NR	0	0,131	NR	0
56	A-SMJ 27	EM	ASMJ	48	1	1	0	1	0	1	1	+	1	+	NR	1	1,100	NR	0
57	A-SMJ 28	IS	ASMJ	30	1	2	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,110	0	0
58	A-SMJ 29	ZS	ASMJ	39	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,092	0	0
59	A-SMJ 30	EW	ASMJ	70	1	1	1	1	0	1	1	+	1	+	NR	1	0,363	1	0
60	A-SMJ 31	AW	ASMJ	48	1	1	0	0	0	1	1	0	1	+	NR	NR	NR	NR	NR
61	A-SMJ 32	AS	ASMJ	41	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,135	0	0
62	A-SMJ 33	GV	ASMJ	50	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	1	0,339	0	0
63	A-SMJ 34	DWM	ASMJ	38	0	1	1	1	0	1	1	+	1	+	NR	1	1,107	1	0
64	A-SMJ 35	LNQ	ASMJ	33	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,147	0	0
65	A-SMJ 36	WQ	ASMJ	33	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,099	0	0
66	A-SMJ 37	EF	ASMJ	47	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,131	0	0
67	A-SMJ 38	SZ	ASMJ	46	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,083	0	0
68	A-SMJ 39	DF	ASMJ	64	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,095	0	0
69	A-SMJ 40	GB	ASMJ	40	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	1	0,528	0	0
70	A-SMJ 41	AV	ASMJ	42	1	1	0	1	0	1	1	0	1	+	NR	1	1,156	NR	0
71	A-SMJ 42	MDSR	ASMJ	32	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,103	NR	0
72	A-SMJ 43	CM	ASMJ	31	1	1	1	1	Anci	0	1	0	1	0	NR	0	0,111	0	0
73	A-SMJ 44	ET	ASMJ	61	1	2	0	1	Anci	0	1	0	1	0	NR	1	0,670	NR	0
74	A-SMJ 45	DS	ASMJ	47	1	2	0	1	0	1	1	+	1	+	NR	1	0,838	NR	0
75	A-SMJ 46	VW	ASMJ	33	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,083	NR	0
76	A-SMJ 47	VH	ASMJ	41	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	1	0,343	0	0
77	A-SMJ 48	NBS	ASMJ	30	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,113	0	0
78	A-SMJ 49	AK	ASMJ	31	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,131	NR	0
79	A-SMJ 50	DP	ASMJ	38	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	NR	0	0,089	0	0

CONTROLES	Nº Registro	Iniciais	Situação	Idade	Sexo	Nº Amostras	Fezes Alíq	Soro Alíq	EPF + Hel	EPF + S.s	HPJ	Média Larvas/HPJ	BM	Média Larvas/BM	Citometria	Sorologia	Sorol/DO	PCR	HTLV 1/2
1	C1	LDO	CH	51	1	1	1	1	0	0	1	0	NR	0	1	0	0,077	0	0
2	C2	CMPO	CH	40	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0,116	0	0
3	C3	AP	CH	58	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0,075	0	0
4	C4	LM	CH	51	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0,074	0	0
5	C5	SE	CH	60	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0,105	0	0
6	C6	HJ	CH	24	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0,118	0	0
7	C7	HI	CH	51	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0,244	0	0
8	C8	JS	CH	57	1	0	0	1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1	0	0,161	NR	0
9	C9	JSL	CH	28	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0,063	0	0
10	C10	HP	CH	25	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0,108	0	0
11	C11	IAV	CH	50	1	1	1	1	0	1	1	5	1	13	1	1	3,188	1	0
12	C12	RBO	CH	48	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0,080	0	0
13	C13	YLF	CH	27	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0,096	0	0
14	C14	AGS	CH	45	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0,105	0	0
15	C15	RDA	CH	50	1	1	1	1	<i>S. mansoni</i>	0	1	0	1	0	1	0	0,163	0	0
16	C16	BCCL	CH	33	1	0	0	1	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1	0	0,125	NR	0
17	C17	AHR	CH	37	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0,091	0	0
18	C18	JLV	CH	55	1	1	1	1	0	1	1	0	1	28	1	0	0,160	1	0
19	C19	CTB	CH	52	0	1	1	1	0	1	1	678	1	2400	1	NR	NR	1	NR
20	C20	ET	CH	58	0	1	0	1	0	1	1	0	1	6	1	1	0,548	NR	0
21	C21	DMA	CH	64	0	1	1	1	0	1	1	1	1	9	1	1	0,361	1	0
22	C22	VMA	CH	58	0	1	0	1	0	1	1	1	NR	NR	NR	0	0,140	NR	0
23	C-SMJ 1	EAS	CSMJ	60	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	1	0,311	0	0
24	C-SMJ 2	RM	CSMJ	22	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,128	0	0
25	C-SMJ 3	MCSR	CSMJ	62	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,082	0	0
26	C-SMJ 4	CH	CSMJ	24	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,127	0	0



CONTROLES	Nº Registro	Iniciais	Situação	Idade	Sexo	Nº Amostras	Fezes Alíq	Soro Alíq	EPF + Hel	EPF + S.s	HPJ	Média Larvas/HPJ	BM	Média Larvas/BM	Citometria	Sorologia	Sorol/DO	PCR	HTLV 1/2
27	C-SMJ 5	EN	CSMJ	24	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,056	0	0
28	C-SMJ 6	PRP	CSMJ	12	0	1	1	1	<i>G. lamblia</i>	0	1	0	0	0	NR	0	0,092	0	0
29	C-SMJ 7	DK	CSMJ	32	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,111	0	0
30	C-SMJ 8	DLCS	CSMJ	54	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,095	0	0
31	C-SMJ 9	EPB	CSMJ	79	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,118	0	0
32	C-SMJ 10	EB	CSMJ	54	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,117	0	0
33	C-SMJ 11	RLC	CSMJ	28	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,067	0	0
34	C-SMJ 12	BB	CSMJ	25	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,125	0	0
35	C-SMJ 13	LE	CSMJ	9	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,083	0	0
36	C-SMJ 14	LLD	CSMJ	41	0	1	1	1	Anci	0	1	0	0	0	NR	0	0,057	0	0
37	C-SMJ 15	ALVL	CSMJ	9	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,084	0	0
38	C-SMJ 16	CB	CSMJ	25	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,193	0	0
39	C-SMJ 17	AS	CSMJ	20	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,126	0	0
40	C-SMJ 18	LS	CSMJ	28	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,113	0	0
41	C-SMJ 19	CCV	CSMJ	17	0	1	1	1	<i>E. histolytica</i>	0	1	0	0	0	NR	0	0,069	0	0
42	C-SMJ 20	SMLN	CSMJ	36	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,089	0	0
43	C-SMJ 21	JHB	CSMJ	20	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	1	1,349	0	0
44	C-SMJ 22	ABS	CSMJ	45	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	1	0,298	0	0
45	C-SMJ 23	LCS	CSMJ	27	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,093	0	0
46	C-SMJ 24	JFP	CSMJ	24	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,085	0	0
47	C-SMJ 25	TF	CSMJ	47	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,123	0	0
48	C-SMJ 26	TSJ	CSMJ	18	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,106	0	0
49	C-SMJ 27	TSG	CSMJ	58	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,081	0	0
50	C-SMJ 28	MG	CSMJ	57	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,127	0	0
51	C-SMJ 29	HHB	CSMJ	63	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,058	0	0
52	C-SMJ 30	WV	CSMJ	17	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,068	0	0
53	C-SMJ 31	BN	CSMJ	11	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,087	0	0
54	C-SMJ 32	DB	CSMJ	21	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,080	0	0

CONTROLES	Nº Registro	Iniciais	Situação	Idade	Sexo	Nº Amostras	Fezes Alíq	Soro Alíq	EPF + Hel	EPF + S.s	HPJ	Média Larvas/HPJ	BM	Média Larvas/BM	Citometria	Sorologia	Sorol/DO	PCR	HTLV 1/2
55	C-SMJ 33	JLW	CSMJ	58	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,118	0	0
56	C-SMJ 34	GV	CSMJ	24	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,115	0	0
57	C-SMJ 35	MBT	CSMJ	57	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	1	0,234	0	0
58	C-SMJ 36	AGT	CSMJ	56	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,129	0	0
59	C-SMJ 37	AKB	CSMJ	42	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,057	0	0
60	C-SMJ 38	OPDB	CSMJ	47	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,082	0	0
61	C-SMJ 39	EF	CSMJ	28	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,128	0	0
62	C-SMJ 40	ACVL	CSMJ	31	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,097	0	0
63	C-SMJ 41	MABP	CSMJ	36	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,129	0	0
64	C-SMJ 42	ES	CSMJ	55	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,148	0	0
65	C-SMJ 43	JJ	CSMJ	35	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,120	0	0
66	C-SMJ 44	IRSS	CSMJ	36	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,153	0	0
67	C-SMJ 45	DJ	CSMJ	27	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,078	0	0
68	C-SMJ 46	MCSS	CSMJ	52	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,087	0	0
69	C-SMJ 47	LTB	CSMJ	72	0	1	1	1	Anci	0	1	0	0	0	NR	0	0,132	0	0
70	C-SMJ 48	SAGR	CSMJ	38	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,090	0	0
71	C-SMJ 49	EAB	CSMJ	30	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,143	0	0
72	C-SMJ 50	NKJ	CSMJ	55	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	NR	0	0,168	0	0

Legenda	
Masculino	1
Feminino	0
Sim	1
Não	0
NR	Não realizado
?	Não é sabido

Situação	
AH	Alcoolista HUCAM
ASMJ	Alcoolista Santa Maria
CH	Controle HUCAM
CSMJ	Controle Santa Maria

Sorologia / HTLV 1/2	
Positivo	1
Negativo	0
Não Realizado	NR

	Positivo Exame Parasitológico de Fezes
	Exame Não Realizado

Comparative study of cultivation of feces in vermiculite or charcoal to obtain larvae of *Strongyloides venezuelensis*

Steven Rios Ribeiro^[1], Caroline Ohnesorge Maia^[1], Fausto Edmundo Lima Pereira^[1]
and Narcisa Imaculada Brant Moreira^[2]

[1]. Programa Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, Núcleo de Doenças Infecciosas, Universidade Federal de Espírito Santo, Vitória, ES. [2]. Departamento de Patologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES.

ABSTRACT

Introduction: We compared feces culturing in charcoal or vermiculite to obtain *Strongyloides venezuelensis* larvae. **Methods:** Feces (5g) from infected rats was mixed with vermiculite (10g) or coal (10g) in plastic cups and incubated at 28°C for 48h. Larvae were recovered using Baermann-Moraes method. **Results:** Significantly higher number of positive larval cultures were recovered from vermiculite than from charcoal (15/17 and 4/17, respectively; $p < 0.001$; 990.6 ± 307.5 and 215 ± 78.1 larvae, $p = 0.027$). **Conclusions:** Vermiculite yields more larvae and provides cleaner pellets, improving larvae identification and facilitating their use for other purposes.

Keywords: Charcoal. *Strongyloides*. Vermiculite.

Cultivation of stool to obtain helminthic larvae is generally carried out with addition of different substrates or by spreading feces on plates containing solidified agar nutrients^{1,2}. The most commonly used culture medium is coal, which must be pure, lacking additives, and, in particular, being free from colloidal silver. Moreover, visualization of the larvae or adult worms is rendered difficult due to the presence of coal particles. Agar culture is laborious and requires appropriate growth medium, adequate glassware, and sterilization systems.

Vermiculite is a compound formed by hydration of basaltic mineral; it has been used as a substrate for fecal culture, particularly in veterinary parasitology, as it has the advantages of being similar to soil and costing less³⁻⁷. It has also been used for growing insect⁸ or nematodes larvae in order to evaluate the larvicidal effects of fungi⁹⁻¹².

Very few reports have compared the culturing of stools in vermiculite vs. that with addition of other media. Steffan et al.¹³ compared the addition of vermiculite or polystyrene pellets to cultivate cattle feces and found that both significantly improved growth of larvae of *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* as compared to the cultivation of feces without additives.

Agyei¹⁴ compared the addition of vermiculite or sawdust to cultivate cattle feces to obtain L3 larvae of *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, and *Oesophagostomum* and

concluded that the number of L3 larvae obtained from sawdust cultures was significantly higher than those obtained by other techniques; the former also did not require further elaborate apparatus.

As there have been no reports comparing the cultivation of feces in vermiculite and charcoal, we here compared vermiculite with charcoal as growth medium for larvae of *Strongyloides venezuelensis*. Feces of Wistar albino rats infected with *S. venezuelensis* (900 larvae, subcutaneously) were collected using an anticoprophagic cage. The eggs were quantified with a McMaster chamber. Two identical samples (in terms of weight and eggs per gram) of feces were homogenized with vermiculite (Vermiculite Insulation Thermo-Acoustic Ltd., Belo Horizonte, MG; granulation 1) or coal (Tobasa Bioindustrial, Tocantinópolis, TO; granulation 4) in disposable plastic cups (200ml) at a ratio of two parts of vermiculite or charcoal to one part stool (e.g., 5g of feces and 10g of vermiculite or charcoal). The cultures were incubated at 28°C for 48h, and were humidified daily with distilled water. The incubation time was based on the time used for cultivation of feces on coal for recovery of larvae of *Strongyloides stercoralis*². Larvae were collected from the plastic cups using the Baermann-Moraes technique and counted in one aliquot of 50µL. The results of culturing in both media are summarized in **Table 1**. Of 17 cultures grown in vermiculite, 15 were positive, with recovery of filarial larvae and, exceptionally, free-living forms of the worm. In contrast, among the 17 cultures on coal, only four were positive. The two negative cultures in vermiculite were also negative in coal. When comparing the positive cultures, the mean number of larvae recovered was significantly higher in cultures containing vermiculite (**Table 1**).

In conclusion, data presented here demonstrated that fecal cultures in the presence of vermiculite, assessed

Address to: Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira. Núcleo de Doenças Infecciosas/CCS/UFES. Av. Marechal Campos 1468, 29040-091 Vitória, ES, Brasil.

Phone: 55 27 3335-7210

e-mail: felp@ndi.ufes.br

Received 29 January 2014

Accepted 19 May 2014

TABLE 1 - Comparison of feces culture in vermiculite or charcoal. Feces of rats infected with *Strongyloides venezuelensis* were mixed with vermiculite or charcoal and incubated at 28°C for 48h.

Culture medium	Positive/total cultures (17)		P*	Larvae (n)** mean ± SD	P***
	n	%			
Vermiculite	15	88.2		990.6 ± 307.5	
Charcoal	4	23.5	<0.001	215 ± 78.1	0.027

*Fisher's exact test; **number of larvae in positive cultures; ***unpaired *t*-test with Welch's correction.

48h after cultivation, yielded significantly better results than cultures grown in the presence of coal, allowing recovery of a larger number of larvae. In addition, the pellet obtained by the Baermann-Moraes method is cleaner, greatly facilitating the identification of larvae and their evolutionary forms, and improving their application for other purposes, such as obtaining antigens and inoculation into experimental animals.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. Arakaki T, Iwanaga M, Kinjo F, Saito A, Asato R, Ikeshiro T. Efficacy of agar-plate culture in detection of *Strongyloides stercoralis* infection. *J Parasitol* 1990; 76:425-428.
2. Nolan TJ, Megyeri Z, Bhopale VM, Schad GA. *Strongyloides stercoralis*: the first rodent model for uncomplicated and hyperinfective strongyloidiasis, the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Infect Dis* 1993; 168:1479-1484.
3. Ogunsusi RA. Evaluation of oxfendazole against natural infections of gastrointestinal nematodes in Nigerian calves. *Res Vet Sci* 1979; 27:246-247.
4. Fossing EC, Knudsen TS, Bjørn H, Nansen P. Development of the free-living stages of *Hyostrongylus rubidus* and *Oesophagostomum* spp. at different temperatures and humidities. *J Helminthol* 1995; 69:7-11.
5. van Wyk JA, Cabaret J, Michael LM. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. *Vet Parasitol* 2004; 119:277-306.
6. van Lieshout L, de Gruijter JM, Adu-Nsiah M, Haizel M, Verweij JJ, Brienen EA, Gasser RB, Polderman AM. *Oesophagostomum bifurcum* in non-human primates is not a potential reservoir for human infection in Ghana. *Trop Med Int Health* 2005; 10:1315-1320.
7. Fernandes A, Pereira AT, Eschenazi PD, Schilter HC, Sousa AL, Teixeira MM, et al. Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or previously infected mice. *Parasite Immunol* 2008; 30:139-149.
8. Boardman LA. Insectary culture of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *N Z Entomol* 1977; 6:316-318.
9. Terrill TH, Larsen M, Samples O, Husted S, Miller JE, Kaplan RM, et al. Capability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce infective larvae of gastrointestinal nematodes in goat feces in the southeastern United States: dose titration and dose time interval studies. *Vet Parasitol* 2004; 120:285-296.
10. Campos AK, Araújo JV, Guimarães MP. Interaction between the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* and infective larvae of *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongyloidea). *J Helminthol* 2008; 82:337-341.
11. Carvalho RO, Araújo JV, Braga FR, Araújo JM, Silva AR, Tavela AO. Predatory activity of nematophagous fungi on infective larvae of *Ancylostoma* sp.: evaluation *in vitro* and after passing through the gastrointestinal tract of dogs. *J Helminthol* 2009; 83:231-236.
12. Araújo JM, Araújo JV, Braga FR, Carvalho RO. *In vitro* predatory activity of nematophagous fungi and after passing through gastrointestinal tract of equine on infective larvae of *Strongyloides westeri*. *Parasitol Res* 2010; 107:103-108.
13. Steffan P, Henriksen SA, Nansen P. A comparison of two methods and two additives for faecal cultivation of bovine trichostrongyle larvae. *Vet Parasitol* 1989; 31:269-273.
14. Agyei AD. An improved method of using sawdust as a faecal culture medium for the production of 3rd stage strongylyate nematode larvae. *Ghana Jnl Agric* 1995; 28-29:11-15.

Peripheral blood CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells in alcoholic patients with *Strongyloides stercoralis* infection

Steeven Rios Ribeiro¹ · Luciana Polaco Covre¹ · Lorenzo Lyrio Stringari¹ · Maria da Penha Zago-Gomes² · Daniel Cláudio Oliveira Gomes^{1,3} · Fausto Edmundo Lima Pereira¹

Received: 26 October 2016 / Accepted: 15 December 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract An increased number of regulatory T (Treg) cells has been reported in patients with HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis* co-infection, suggesting the contribution of these cells to worm survival. As *Strongyloides* infections have been found to be highly prevalent in chronic alcoholics, we investigated the effect of abusive ethanol ingestion on the induction of Treg cells in alcoholic patients with *Strongyloides* infection. Treg cells were assessed by flow cytometry in the peripheral blood of 12 healthy non-alcoholic (control) and 14 alcoholic patients (alcoholic) without *Strongyloides* infection and five non-alcoholics (controlSs) and five chronic alcoholics (alcoholSs) with *Strongyloides* infection. The results showed significantly higher frequencies of Treg cells in the alcoholic, controlSs and alcoholSs group patients than in the control group patients. However, the frequencies of Treg cells did not differ between the alcoholSs and controlSs groups. In conclusion, our results demonstrate that ethanol consumption induced an increase in the number of circulating Treg cells in chronic alcoholics in this study but was unable to potentiate the induction of these cells in alcoholics with *Strongyloides* infection.

Keywords *Strongyloides stercoralis* · Alcoholism · Treg cells

✉ Fausto Edmundo Lima Pereira
felp@ndi.ufes.br

¹ Núcleo de Doenças Infecciosas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468, Vitória, ES CEP: 29043-900, Brazil

² Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

³ Núcleo de Biotecnologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil

Chronic alcoholism is associated with reduced immune responses, favouring some bacterial and viral infections (Szabo and Mandrekar 2009). In addition, higher prevalence of *Strongyloides stercoralis* infection has been reported in chronic alcoholic than in non-alcoholic patients admitted to the same hospital (de Oliveira et al. 2002; Zago-Gomes et al. 2002). *S. stercoralis* is the only human metazoan parasite with potential for autoinfection and multiplication within the host. Infective filariform larvae developed in environment penetrate the intact human skin and, by various often random routes, migrate to the duodenum. More commonly, the infective larvae migrate to the lungs by the blood stream, ascending the tracheobronchial tree to enter the gastrointestinal tract. However, larvae also can reach the small intestine directly via connective tissues. Only adult females develop in the duodenum. They reproduce by parthenogenesis originating eggs that quickly hatch releasing rhabditiform larvae. These are eliminated with the faeces, and in the external environment, they originate as free-living males and females or infective filariform larvae. In autoinfection, some rhabditiform larvae become filariform infective larvae before being excreted, which can penetrate either the intestinal mucosa (internal autoinfection) or the perianal skin area (external autoinfection). In either case, the filariform larvae reach the duodenum via the same pathway of infective larvae coming from environment (Nutman 2016).

Although the hygiene profile of chronic alcoholics may be associated with increased exposure to this parasite, it has been assumed that the immune modulation induced by abusive ethanol ingestion may be involved in the increased survival of *S. stercoralis* observed in alcoholics (de Oliveira et al. 2002; Marques et al. 2010). However, factors mediating the higher prevalence of *S. stercoralis* in alcoholics remain unclear. Although the mechanisms involved in resistance to *S. stercoralis* infection have not yet been fully elucidated,

studies using experimental rodent models have shown that innate and adaptive immune responses play a role in these mechanisms (Breloer and Abraham 2016). Studies in humans have shown that once an infection is established, a predominance of Th2 response is observed, resulting in the production of anti-inflammatory cytokines and a reduction in the activity of Th1 and Th17 responses (Anuradha et al. 2015). Higher parasite burden and low eosinophil counts have been reported in patients with *S. stercoralis* and human T leukaemia virus 1 (HTLV-1) co-infection, in which there was low production of IL-5 after in vitro stimulation of peripheral blood mononuclear cells with the *S. stercoralis* antigen. These patients have an increased number of peripheral blood Treg cells suggesting that Treg cells play a role in susceptibility to *S. stercoralis* infection (Montes et al. 2009; Barros et al. 2012). The role of Treg cells in increasing the survival of female *S. stercoralis* in human hosts is further supported by findings suggesting that these cells promote the survival of other helminths in human and experimental models (Blankenhaus et al. 2014; Wammes et al. 2012).

A reduction in the number of Treg cells in peripheral blood has been reported in patients with alcoholic hepatitis (Almeida et al. 2013). However, in that study, while the group of alcoholics without liver disease had a higher number of Treg cells than did healthy individuals, the difference did not reach statistical significance. This finding points to the possibility that abusive ethanol ingestion induces Treg cell activation. Moreover, in mice chronically intoxicated with ethanol, dendritic cells transfected with HCV antigens were able to induce Treg cells when transferred to control mice, suggesting a relationship between the consumption of ethanol and Treg induction (Ortiz and Wands 2014).

Taking into account the increased susceptibility to *S. stercoralis* infection observed in alcoholic patients and the possibility that Treg cells play a role in this susceptibility, the aim of this study was to evaluate the frequencies of Treg cells in the peripheral blood of alcoholics and non-alcoholics, both with and without *S. stercoralis* infection. Our hypothesis was that ethanol may contribute to Treg induction in alcoholics infected with *S. stercoralis*, similar to the contribution of HTLV-1 in patients with HTLV-1 and *S. stercoralis* co-infection.

The study sample included 12 non-alcoholic healthy controls (eight males and four females; median age: 46.6 years) who were negative for *S. stercoralis* and other helminth infection, five non-alcoholic patients with *S. stercoralis* infection (two males, three females; median age: 55.0 years), 14 chronic alcoholics negative for *S. stercoralis* infection (12 males and two females; median age: 49.5 years) and five alcoholics positive for *S. stercoralis* infection (four male and one female; median age: 46.0 years). All patients tested negative for human immunodeficiency virus, hepatitis B and C virus and HTLV-1 and 2 infections. Parasitological examination was

performed by the spontaneous sedimentation and Baermann-Moraes methods (Melvin and Brooke 1982). The diagnosis of chronic alcoholism was according to the WHO criteria (F10.2, ICD 10, 2002) and patients were diagnosed with chronic alcoholism when their ethanol ingestion exceeded 80 g per day (men) or 40 g per day (women) for 10 years or longer.

Blood was collected by venous puncture into an EDTA vacutainer tube (BD vacutainer tube, Becton Dickison Co, UK). For the analysis of Treg cells, the Human Regulatory T Cell Staining Kit (eBioscience, San Diego, CA, USA) was used. First, cells were stained with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD4 and phycoerythrin-cyanin 5-conjugated anti-CD25 (SK3 and BC96, respectively; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) in 200 µl of whole blood. After surface staining, red blood cells were lysed and fixed with BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, San Jose, CA) and then permeabilized and stained with phycoerythrin-conjugated FoxP3 (forkhead box P3) (236A/E7). Regulatory T cells were analysed according to the manufacturer's instructions. Isotype-negative controls included a mouse isotype matched to a non-relevant immunoglobulin. Data were collected using the BD FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and analysed using FlowJo software (TreeStar, San Carlos, CA, USA). All patients signed an informed consent form, and this study was approved by the ethics committee of CCS-UFES (protocol number 03586812.1.0000.5071).

The results are summarized in Fig. 1. As demonstrated, there were significantly higher frequencies of Treg cells in the alcoholic group than in the non-alcoholic group (control) when both groups were negative for *S. stercoralis* infection. Non-alcoholic group patients infected with *S. stercoralis* also presented significantly higher frequencies of Treg cells than did the control group patients; however, the frequencies observed in this group did not differ significantly from those

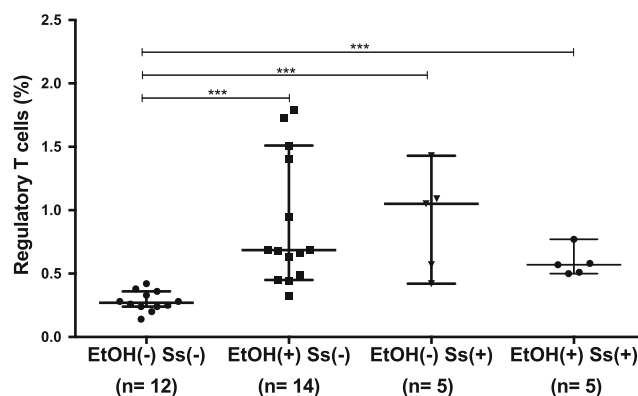


Fig. 1 Frequency of peripheral blood regulatory T cells in alcoholic and non-alcoholic patients with or without *Strongyloides stercoralis* infection. EtOH(-) Ss(-): non-alcoholic *S. stercoralis* negative group; EtOH(+) Ss(-): alcoholic *S. stercoralis* positive group; EtOH(-) Ss(+): non-alcoholic *S. stercoralis* positive group; EtOH(+) Ss(+): alcoholic *S. stercoralis* positive group. *** $p < 0.0005$

observed in alcoholic patients without *S. stercoralis* infection. The frequencies of Treg cells in alcoholic group patients with *S. stercoralis* were also significantly higher than those detected in the control group patients. However, when compared to alcoholic patients without *S. stercoralis* or with non-alcoholic patients with *S. stercoralis* infection, the frequencies of Treg cells in alcoholics with *S. stercoralis* infection were lower, but this difference did not reach statistical significance.

Our results demonstrate that the frequency of Treg cells in the peripheral blood of chronic alcoholic patients was significantly higher than in those of non-alcoholic group patients when both groups were not infected with *S. stercoralis*. This result is somewhat different from the findings reported for patients with alcoholic hepatitis (Almeida et al. 2013) and decompensated alcoholic cirrhosis (Kasztelan-Szczerbińska et al. 2015). In patients with alcoholic liver disease, the immune response is more inflammatory, resulting in an increase in Th17 activity (Kasztelan-Szczerbińska et al. 2015), which induces greater liver damage. In fact, in alcoholic patients without liver disease, as reported by Almeida et al. (2013), the frequencies of Treg cells showed a clear increasing trend; similar findings were reported for cirrhotic patients by Kasztelan-Szczerbińska et al. (2015). Greater reductions in Treg cells were observed in patients with more severe forms of these diseases. The alcoholic patients studied here included alcoholics without clinical or laboratory evidence of liver disease. Thus, we suggest that abusive use of ethanol may induce increased Treg cells, which may reduce the potentially harmful effect of ethanol on the liver, thereby reducing the parallel inflammatory responses in the liver, as shown in patients with alcoholic hepatitis (Almeida et al. 2013) and decompensated liver cirrhosis (Kasztelan-Szczerbińska et al. 2015).

Increased frequencies of Treg cells have not been reported in humans infected with *S. stercoralis* in the absence of other associated factors. The results presented here demonstrate that increased frequencies of peripheral Treg cells were observed in non-alcoholic patients with *Strongyloides* infection, which is in accordance with previous observations regarding the role of Treg cells in the survival of other helminths in humans and experimental models (Blankenhaus et al. 2014; Wammes et al. 2012).

The increased frequencies of Treg cells observed in alcoholics without liver disease may be a factor that promotes the survival of *S. stercoralis* in these patients, as this was identified in association with HTLV-1 infection (Montes et al. 2009). However, the frequencies of Treg cells in alcoholic patients with *Strongyloides* infection, although significantly higher than those in control group patients, did not differ significantly from alcoholic group patients without *S. stercoralis* or from non-alcoholic patients with *S. stercoralis* infection. Additionally, unlike non-alcoholic patients infected with *S. stercoralis*, a decreasing trend in the frequencies of Treg cells was observed in alcoholic and *S. stercoralis*-infected

patients. Thus, ethanol did not appear to induce increased Treg in the group of alcoholic patients infected with *S. stercoralis*.

The lack of evidence supporting a possible enhancing effect of ethanol on the frequencies of Treg cells detected in alcoholic patients infected with *S. stercoralis* may be related to the fact that in this group, all patients had compensated liver disease, whereas alcoholic patients without *S. stercoralis* did not have signs of liver disease. Worsening of liver disease is accompanied by a reduction in the frequency of Treg cells in the circulating blood of patients with hepatitis (Almeida et al. 2013) and decompensated liver cirrhosis (Kasztelan-Szczerbińska et al. 2015).

In conclusion, our results demonstrate that the abusive consumption of ethanol is associated with increased regulatory T cell frequencies in alcoholics without liver disease. Additionally, the results demonstrate increased frequencies of peripheral Treg cells in non-alcoholic patients infected with *S. stercoralis*. However, there was no evidence of an effect of abusive ethanol ingestion on increased induction of Treg cells in alcoholic patients infected with *S. stercoralis*. Further investigations are necessary to clarify the role of ethanol abuse in Treg induction and the impact of these cells on parasite survival in alcoholic patients with *S. stercoralis* infection.

Acknowledgments The authors wish to express their gratitude to Prof. Rodrigo Ribeiro Rodrigues (Núcleo de Doenças Infecciosas, UFES) for the excellent technical support.

Compliance with ethical standards All patients signed an informed consent form, and this study was approved by the ethics committee of CCS-UFES (protocol number 03586812.1.0000.5071).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Almeida J, Polvorosa MA, Gonzalez-Quintela A, Marcos M, Pastor I, Hernandez Cerceño ML, Orfao A, Laso FJ (2013) Decreased peripheral blood CD4+/CD25+ regulatory T cells in patients with alcoholic hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 37:1361–1369
- Anuradha R, Munisankar S, Dolla C, Kumaran P, Nutman TB, Babu S (2015) Parasite antigen-specific regulation of Th1, Th2, and Th17 responses in *Strongyloides stercoralis* infection. *J Immunol* 195: 2241–2245
- Barros N, Woll F, Watanabe L, Montes M (2012) Are increased Foxp3+ regulatory T cells responsible for immunosuppression during HTLV-1 infection? Case reports and review of the literature. *BMJ Case Rep*. 2012
- Blankenhaus B, Reitz M, Brenz Y, Eschbach ML, Hartmann W, Haben I, Sparwasser T, Huehn J, Kühl A, Feyerabend TB, Rodewald HR, Breloer M (2014) Foxp3+ regulatory T cells delay expulsion of intestinal nematodes by suppression of IL-9-driven mast cell

- activation in BALB/c but not in C57BL/6 mice. *PLoS Pathog* 10(6): e1003913
- Breloer M, Abraham D (2016) *Strongyloides* infection in rodents: immune response and immune regulation. *Parasitology* 24:1–21
- de Oliveira LC, Ribeiro CT, Mendes Dde M, Oliveira TC, Costa-Cruz JM (2002) Frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in alcoholics. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97:119–121
- Kasztelan-Szczerbińska B, Surdacka A, Celiński K, Roliński J, Zwolak A, Miącz S, Szczerbiński M (2015) Prognostic significance of the systemic inflammatory and immune balance in alcoholic liver disease with a focus on gender-related differences. *PLoS One* 10(6):e0128347
- Marques CC, Zago-Gomes MP, Gonçalves CS, Pereira FE (2010) Alcoholism and *Strongyloides stercoralis*: daily ethanol ingestion has a positive correlation with the frequency of *Strongyloides* larvae in the stools. *PLoS Negl Trop Dis* 4(6):e717
- Melvin DM, Brooke MM. (1982) Laboratory procedures for the diagnosis of intestinal parasites. 3rd Edition. US Dept. of Health and Human Services publication no. (CDC) 82–8282. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention
- Montes M, Sanchez C, Verdonck K, Lake JE, Gonzalez E, Lopez G, Terashima A, Nolan T, Lewis DE, Gotuzzo E, White AC Jr (2009) Regulatory T cell expansion in HTLV-1 and strongyloidiasis coinfection is associated with reduced IL-5 responses to *Strongyloides stercoralis* antigen. *PLoS Negl Trop Dis* 3(6):e456.
- Nutman TB (2016) Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. *Parasitology* 16:1–11
- Ortiz V, Wands JR (2014) Chronic ethanol diet increases regulatory T-cell activity and inhibits hepatitis C virus core-specific cellular immune responses in mice. *Hepato Res* 44:788–797
- Szabo G, Mandrekar P (2009) A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcohol Clin Exp Res* 33:220–232
- Wammes LJ, Hamid F, Wiria AE, Wibowo H, Sartono E, Maizels RM, Smits HH, Supali T, Yazdanbakhsh M (2012) Regulatory T cells in human lymphatic filariasis: stronger functional activity in microfilaremic. *PLoS Negl Trop Dis* 6(5):e1655
- Zago-Gomes MP, Aikawa KF, Peraziao SF, Gonçalves CS, Pereira FE (2002) Prevalence of intestinal nematodes in alcoholic patients. *Rev Soc Bras Med Trop* 35:571–574