

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

ELISA RABELLO LAIGNIER

**DIAGNÓSTICO DE *STRONGYLOIDES STERCORALIS* A PARTIR DA
ANÁLISE DE SEDIMENTO OBTIDO COM DEZ OU MAIS GRAMAS DE
FEZES: PROPOSTA DE UM MÉTODO COM USO DE MICROSCÓPIO
INVERTIDO**

VITÓRIA
2011

ELISA RABELLO LAIGNIER

**DIAGNÓSTICO DE *STRONGYLOIDES STERCORALIS* A PARTIR DA
ANÁLISE DE SEDIMENTO OBTIDO COM DEZ OU MAIS GRAMAS DE
FEZES: PROPOSTA DE UM MÉTODO COM USO DE MICROSCÓPIO
INVERTIDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito
Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de
Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientador: Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

VITÓRIA

2011



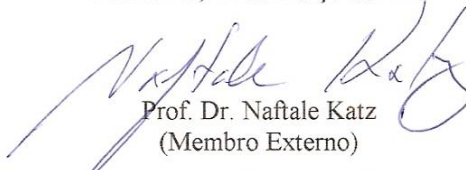
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

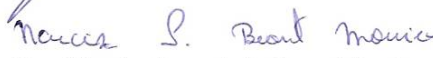
PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

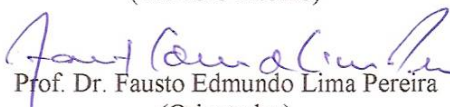
O mestrando ELISA RABELLO LAIGNIER apresentou dissertação intitulada: “DIAGNÓSTICO DO *Strongyloides stercoralis* ATRAVÉS DA ANÁLISE DE SEDIMENTO OBTIDO A PARTIR DE DEZ OU MAIS GRAMAS DE FEZES: PROPOSTA DE UM MÉTODO COM USO DE MICROSCÓPIO INVERTIDO” em sessão pública, no dia 18 de março de 2011, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu **aprovar sem restrições**, a dissertação e habilitar a veterinária ELISA RABELLO LAIGNIER, a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória-ES, 18 de março de 2011


Prof. Dr. Naftale Katz
(Membro Externo)


Prof. Dra. Narcisa Imaculada Brant Moreira
(Membro Interno)


Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
(Orientador)

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Laignier, Elisa Rabello, 1982-

L185d Diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* a partir da análise de sedimento obtido com dez ou mais gramas de fezes : proposta de um método com uso de microscópio invertido / Elisa Rabello Laignier. – 2011.

78 f. : il.

Orientador: Fausto Edmundo Lima Pereira.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Estrongiloidíase. 2. *Strongyloides stercoralis*. 3. Exame coproparasitológico. I. Pereira, Fausto Edmundo Lima. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

A meus pais:
Dejair e Irene

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fausto, pela enorme dedicação e pela confiança depositada em mim para execução desse relevante trabalho. Uma pessoa que não mede esforços para ajudar a quem precisa!

Aos meus pais, Dejair e Irene, minha irmã, Luiza e Bellinha pelo amor incondicional.

A Mayra e ao Marcos Alexandre pela colaboração na elaboração do projeto e pela minha condução ao Núcleo de Doenças Infecciosas.

À Dani, Eneida, Mari e Lícia que me ajudaram durante o processo seletivo para ingressar no mestrado.

Ao Léo e Victor, pelo suporte virtual.

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

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Cassiano Antonio de Moraes, em especial Marco Antônio, Fernando, Cleber Vieira, Rose, Jane e Zelina.

Aos funcionários do Núcleo de Doenças Infecciosas em especial, Roseane.

À Dra. Isabeli e a todos os outros funcionários do Hospital que colaboraram na obtenção das amostras de pacientes internados.

Às Professoras Cinthia, Narcisa e Blima pelo suporte durante meus experimentos.

Aos queridos do Laboratório de Parasitologia da UFES: Adelson, Nica, Etelvina e Claudinei.

À professora Liliana Cruz Spano e as funcionárias Heloísa e Érica por toda a valiosa ajuda.

À querida Fátima Aparecida Pereira, pela amizade e paciência com que resolvia nossos problemas relacionados ao Programa.

As amigas do Laboratório: Maria Augusta, Cynara, Julyana e Ana Paula. Obrigada pela companhia e por boas risadas!

A todos os meus colegas de mestrado por esses dois anos, em especial, minha dupla, Thiago de Almeida Pereira.

Ao meu grande amigo e colega de mestrado Steveen Rios Ribeiro, por todo ensinamento, ajuda e paciência.

À Universidade Federal do Espírito Santo.

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

À professora Angélica Espinosa Barbosa Miranda por toda sua paciência e dedicação aos alunos da Pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

À equipe do laboratório de rotina do hospital de Santa Maria de Jetibá.

À Dra. Maria Adília Binda e a todos do laboratório Bioclínico.

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

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Alguns dos eventos importantes relacionados com a descoberta de <i>Strongyloides stercoralis</i> e de seu ciclo biológico.....	20
Tabela 1. Comparação dos resultados obtidos na pesquisa de larvas rabditóides de <i>S. stercoralis</i> utilizando o método de Hoffman, Pons & Janer da rotina do laboratório e a observação de todo o sedimento obtido por sedimentação espontânea, com o uso do microscópio invertido.....	51
Tabela 2. Comparação dos resultados obtidos na pesquisa de larvas rabditóides do <i>S. stercoralis</i> utilizando o método de Baermann–Moraes e a observação de todo o sedimento obtido por sedimentação espontânea, utilizando o microscópio invertido.....	52
Tabela 3. Número de larvas de <i>Strongyloides stercoralis</i> observadas no método de Baerman-Moraes e no exame de todo o sedimento com o microscópio invertido.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas adultas e larvais de <i>Strongyloides stercoralis</i>	21
Figura 2. Representação esquemática do ciclo evolutivo de <i>Strongyloides stercoralis</i>	22
Figura 3. A. Frasco descartável de cultivo celular que serviu de modelo para construção da câmara de vidro para exame do sedimento fecal com microscópio invertido. B. Microscópio invertido utilizado no exame do sedimento fecal com a câmara inserida na platina.....	42
Figura 4. Fotomicrografias do sedimento examinado com o microscópio invertido mostrando campos com larvas rabditóides de <i>S. stercoralis</i> vistas com objetiva de 4x(A), 10x(B) e 20x(C e D).....	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1- A descoberta de <i>Strongyloides stercoralis</i> e a identificação do seu ciclo biológico.....	19
2.2. Aspectos morfológicos de <i>S. stercoralis</i>	21
2.3. O ciclo biológico de <i>S. stercoralis</i>	22
2.4. Diagnóstico laboratorial da infecção com <i>S. stercoralis</i>	24
2.4.1. A identificação de larvas rabditóides no exame coproparasitológico.....	25
2.4.2. Métodos indiretos de diagnóstico do <i>S. stercoralis</i>	27
2.4.2.1. Diagnóstico imunológico da infecção com <i>S. stercoralis</i> através da pesquisa de anticorpos anti-antígenos do parasita no sangue circulante e em outros líquidos corpóreos.....	28
2.4.2.2. A especificidade nos testes para pesquisa de anticorpos anti- <i>Strongyloides</i> utilizando os antígenos obtidos de larvas de <i>S. stercoralis</i> , <i>S. ratti</i> ou <i>S. venezuelensis</i>	33
2.4.2.3. Testes intradérmicos no diagnóstico de infecção com o <i>S. stercoralis</i>	35
2.4.2.4. Detecção de antígenos do <i>S. stercoralis</i> nas fezes por métodos imunológicos ou por métodos de biologia molecular.....	36
3.0. OBJETIVOS.....	38
4.0. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1. Utilização do microscópio invertido para identificação de larvas de <i>S. stercoralis</i> no sedimento obtido por sedimentação espontânea.....	41
4.2. Avaliação da eficácia do método para identificação das larvas rabditóides de <i>S. stercoralis</i> utilizando o microscópio invertido.....	43
5. RESULTADOS.....	47

5.1. A execução da técnica para observação do sedimento com a utilização do microscópio invertido.....	48
5.2. Resultados observados com a utilização do microscópio invertido em laboratórios de rotina que realizam somente o HPJ.....	50
5.3. Resultados do exame feito com o microscópio invertido e com o método de Baermann-Moraes, nas mesmas amostras.....	51
5.4. Avaliação do sedimento obtido de fezes preservadas com formol tamponado ou com solução de mertiolate, formol e iodo (MIF)	53
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÃO.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
Anexo I	72
Anexo II.....	75
Anexo III.....	77

RESUMO

Introdução. Os métodos de Baermann-Moraes e Koga ágar, são os mais sensíveis para identificação de larvas de *Strongyloides stercoralis* nas fezes, mas exigem que as mesmas sejam frescas e com larvas vivas. Neste trabalho, apresentamos um método de sedimentação simples, que permite avaliar uma grande amostra de fezes, com exame de todo o sedimento obtido, utilizando microscópio invertido.

Objetivos. Desenvolver e avaliar uma metodologia de diagnóstico de larvas de *S. stercoralis* a partir da sedimentação espontânea de fezes, examinando todo o sedimento ao microscópio invertido e comparar a metodologia proposta com o método de Hoffman, Pons e Janer (HPJ) e com o método de Baermann-Moraes, considerado de alta sensibilidade para diagnóstico de larvas de *S. stercoralis*.

Material e Métodos. Para avaliar a eficácia da técnica proposta, foram realizadas duas observações experimentais: (a) utilização da técnica em laboratório de rotina que realizava os exames coproparasitológicos pelo método de Hoffman, Pons & Janer; (b) realização simultânea, na mesma amostra, do método proposto e do método de Baermann-Moraes, para comparação. Para a primeira observação, a técnica proposta foi realizada no laboratório de rotina do Hospital Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) e no Hospital Fundação Concórdia, de Santa Maria de Jetibá. Foram examinadas 221 amostras de fezes de pacientes atendidos nos ambulatórios do HUCAM ou internados, que também foram rotineiramente examinadas pelo método de sedimentação (HPJ). No Hospital Fundação Concórdia em Santa Maria de Jetibá, foram avaliadas simultaneamente 102 amostras consecutivas de pacientes atendidos nos ambulatórios da fundação. Para a segunda observação, foram analisadas 112 amostras de pacientes internados e atendidos no HUCAM pelo método do microscópio invertido e pelo Baermann-Moraes. As amostras foram pesadas e homogeneizadas com água corrente e bastão de vidro, no próprio recipiente e em seguida, tamisadas em gaze em um cálice de sedimentação de 250 ml. Após uma hora, as amostras foram lavadas, com água corrente e sedimentadas por mais uma hora. Todo o sedimento (aproximadamente 15 ml), acrescido de duas a três gotas de lugol, foi colocado em uma câmara de vidro de 12x8x0,5 cm, coberta com lâmina de vidro com mesma superfície e examinada em microscópio invertido, com objetivas de 4X e 10X. Toda a câmara foi analisada, sendo contadas as larvas encontradas. **Resultados.** Das 221 amostras analisadas no Laboratório do HUCAM,

larvas de *S. stercoralis* foram identificadas em 20 (9,05%) casos, enquanto o HPJ só identificou 9 (4,07%). Das 102 do Hospital Fundação Concórdia, onde a identificação de larvas nos seis meses anteriores não passou de 1,5%, 10 amostras foram positivas pelo exame do sedimento no microscópio invertido (9,8%). Das 112 amostras utilizadas para comparação com o Baermann-Moraes, 11 (9,82%) amostras foram positivas no exame do sedimento ao microscópio invertido, as quais foram também positivas no método de Baermann-Moraes. **Conclusão.** O método é simples, com as seguintes vantagens: (a) todo o sedimento obtido é examinado de uma só vez, permitindo identificar todas as larvas nele existentes; (b) como a quantidade de fezes examinada é grande (maior do que as 8 a 10g do Baermann-Moraes), a probabilidade de encontrar larvas aumenta, mesmo em casos com baixa carga parasitária; e (c) permite a identificação de larvas mortas, ao contrário do método de Baermann-Moraes, podendo, portanto ser aplicado em fezes preservadas com fixadores como formol tamponado ou MIF.

Palavras-chaves: Estrongiloidíase; *Strongyloides stercoralis*; exame coproparasitológico.

ABSTRACT

Introduction. The methods of Baermann-Moraes and Koga agar, are the most sensitive to identify *Strongyloides stercoralis* larvae in stool, but they require a fresh stool. We present a simple sedimentation method, which allows to evaluate a large sample of feces, using an inverted microscope to observe the sediment obtained.

Objectives. To develop and evaluate a modified methodology to identify larvae of *S. stercoralis* from the sedimentation of feces, by examining all the sediment using an inverted microscope and to compare the proposed method with the Hoffman, Pons and Janer method (HPJ) and the Baermann-Moraes, considered highly sensitive for diagnosis of larvae of *S. stercoralis*.

Material and Methods. To evaluate the effectiveness of the technique, there were two things to consider: (a) test the technique in the laboratory that performs the routine fecal examinations using the Hoffman, Pons & Janer method; (b) use the same sample, simultaneously, performing the method proposed and the Baermann-Moraes, for comparison. For the first observation, we used the routine laboratory of the Hospital Cassiano Antonio de Moraes - HUCAM – and the Hospital Fundação Concor dia in Santa Maria de Jetibá. We examined 221 faecal samples from patients treated in ambulatory or hospitalized in HUCAM, without any choice, they were also routinely examined by sedimentation method (HPJ). At the Hospital Fundação Concor dia in Santa Maria de Jetibá we evaluated 102 consecutive samples from patients treated in ambulatory. For the second point, 112 samples were analyzed using the inverted microscope method and the Baermann-Moraes technique. The samples were weighed and mixed with water using a glass rod in the same small container and then strained through gauze into a glass sedimentation measuring 250 ml. After an hour, the samples were washed with water and then allowed to stand for one more hour. The sediment (about 15 ml), plus two to three drops of Lugol was placed in a glass chamber measuring 12x8x0,5 cm, covered with a glass slide with the same surface and examined using an inverted microscope with 4X and 10X objective . The entire chamber was analyzed, and the number of larvae, was counted.

Results. Of the 221 samples analyzed at the HUCAM laboratory, larvae of *S. stercoralis* were identified in 20 (9.05%) cases, in which the HPJ identified only nine (4.07%). The 102 samples from Hospital Fundação Concor dia, where the identification of larvae in the previous six months did not exceed 1.5%, 10 samples were positive using the inverted microscope (9.9%).

The 112 samples used simultaneously to compare with the Baermann-Moraes technique, 11 samples were positive using the inverted microscope and all were also positive in the Baermann-Moraes method. **Conclusion.** The method is simple, with the following advantages: (a) the sediment obtained is examined at once, allowing the identification of all larvae existed there; (b) as the amount of stool examined is large (more than 8 to 10g used in Baermann-Moraes and 2 to 4 g used to perform the Koga agar), the probability of finding larvae increases, even in cases with low parasite load; and (c) allows the identification of dead larvae, unlike both the Baermann-Moraes and the Koga agar and could also be applied in faeces preserved with buffered formalin as fixatives or MIF.

Key words: Strongyloidiasis; *Strongyloides stercoralis*; coproparasitologic exam.

INTRODUÇÃO

As parasitoses intestinais constituem um problema de Saúde Pública em países em desenvolvimento (MONTEIRO et al., 1986; WHO, 1987). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2004), mais de 2 bilhões de pessoas estão infectadas com algum tipo de verme ou parasito. No Brasil estima-se que aproximadamente 30% das pessoas são portadoras de algum tipo de parasito, significando cerca de 50 milhões de pessoas com verminoses. Entre os parasitas intestinais freqüentes no nosso meio estão os geohelmentos *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancilostoma duodenale*, *Necator americanus* e *Strongyloides stercoralis*.

Strongyloides stercoralis (Bavay, 1896) é um nematódeo intestinal de grande importância por ser um dos únicos parasitas intestinais que pode proliferar no hospedeiro, produzindo auto-infecção. Embora a maioria das pessoas infectadas sejam oligo ou assintomáticas, em condições especiais de imunossupressão, a auto-infecção pode aumentar e induzir as formas graves e disseminadas da doença (GROVE, 1996).

O diagnóstico do *S. stercoralis* pode ser feito: (a) pela identificação das larvas nas fezes; (b) por pesquisa de antígenos nas fezes com métodos imunológicos ou de biologia molecular; ou (c) por identificação, no sangue circulante, de anticorpos anti-antígenos do parasita. A identificação de larvas rhabditóides nas fezes é a maneira mais fácil e precisa para o diagnóstico, já que os métodos sorológicos enfrentam problemas de especificidade e os métodos de identificação de antígenos nas fezes, quer por métodos imunológicos ou de biologia molecular, são dispendiosos e ainda pouco testados.

A identificação de larvas nas fezes é fácil, pois as larvas não só são facilmente identificáveis como podem ser diferenciadas de larvas de outros parasitas com certa facilidade. No entanto, os métodos rotineiros de exame de fezes, como a sedimentação espontânea e métodos de concentração, têm baixa sensibilidade, considerando que, geralmente nesses métodos a amostra examinada ao microscópio é muito pequena. É sábio que o número de larvas eliminadas é variável, geralmente pequeno nos pacientes oligo ou assintomáticos, e com periodicidade variável. A sensibilidade da pesquisa de larvas nas fezes aumenta com o número de exames realizados em tempos diferentes.

Dois métodos específicos para identificação de larvas de *S. stercoralis* nas fezes têm sido considerados de melhor sensibilidade do que métodos de sedimentação ou concentração: o método de Baermann-Moraes e a cultura de fezes em placas de Ágar. Esses métodos, embora mais sensíveis, são trabalhosos, consomem tempo e só têm validade se efetuados com fezes frescas contendo larvas vivas, pois em ambos as larvas são detectadas após a sua migração.

Há, portanto, necessidade de tentar métodos de identificação de larvas de *S. stercoralis* que sejam simples, de baixo custo e que possam ser executados em fezes preservadas com líquidos fixadores utilizados na rotina. Nessa dissertação descrevemos um método para identificar larvas de *S. stercoralis* em fezes, examinando todo o sedimento de uma quantidade expressiva de fezes, utilizando um microscópio invertido.

REVISÃO DA LITERATURA

O *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1876) pertence à família Strongyloidea (Classe Secernentea, Ordem Rhabditida, Superfamília Rhabditoidea), que é formada somente por três gêneros, *Strongyloides*, *Parastrongyloides* e *Leiperinema*. Os membros desta família, também chamados vermes filiformes, são heterogônicos, com geração parasítica e de vida-livre e compreende pelo menos 52 espécies (GROVE, 1996).

O homem é naturalmente infectado pela espécie *S. stercoralis*, mas infecção natural pelo *S. fuelleborni* tem sido descrita em algumas regiões da África e das Filipinas. Infecções patentes não foram encontradas após infecção experimental de humanos com *S. canis*, *S. cebus*, *S. felis*, *S. myopotami*, *S. planiceps*, e *S. simiae* (GROVE, 1996).

2.1. A descoberta de *Strongyloides stercoralis* e a identificação de seu ciclo biológico

O quadro 1 resume os principais eventos sobre a descoberta, a classificação, a identificação dos estágios larvares, do ciclo biológico e dos mecanismos de infecção de *S. stercoralis*. Alguns aspectos da biologia de *S. stercoralis*, especialmente os mecanismos que governam a diferenciação das larvas em formas infectantes ou machos e fêmeas de vida livre, permanecem ainda por serem totalmente esclarecidos (GROVE, 1996).

NOME DO AUTOR	ANO	EVENTO
Normand	1876	Descoberta do parasita
Bavay	1876	Descreveu o parasita com o nome de <i>Anguillula stercoralis</i>
Grassi, Parona, Parona	1878	Descreveram as larvas rabditóides, as fêmeas de vida livre e as larvas filarióides; Mudança do nome para <i>Anguillula intestinalis</i>
Grassi	1879	Criou o gênero <i>Strongyloides</i> , mudando a denominação do parasita para <i>Strongyloides intestinalis</i>
Perroncito	1881	Observou a transformação da larva rabditóide em machos e fêmeas de vida livre produzindo a filarióide (infectante)
Leuckart	1883	Demonstrou que as formas descritas eram diferentes fases no ciclo de vida de um único <i>Strongyloides</i>
Stiles, Hassal	1902	Denominaram o parasita como <i>Strongyloides stercoralis</i>
Durme, Ranson	1902-1907	Demonstraram a migração pulmonar e penetração da larva pela pele
Looss	1905	Demonstrou que a infecção ocorria pela penetração da larva pela pele de onde migrava para pulmões, traquéia e intestino
Gage	1911	Demonstrou a ocorrência da auto-infecção
Fuelleborn	1914	Confirmou o ciclo migratório das larvas
Cram	1936-1939	Introduziu conceito de que as fêmeas parasitas são partenogênicas

Quadro 1. Alguns dos eventos importantes relacionados com a descoberta do *Strongyloides stercoralis* e de seu ciclo biológico. As referências de cada autor estão citadas em Moraes (1948) e Grove (1996).

2.2. Aspectos morfológicos de *Strongyloides stercoralis*

Strongyloides stercoralis apresentam diferentes formas evolutivas (NEVES et al., 2005). As fêmeas parasitas, partenogenéticas, vivem no duodeno e são as maiores formas. As larvas rabaditóides são menores que as larvas filarióides, delas se distinguindo pela extremidade anterior romba e pelo esôfago com dois bulbos. As fêmeas de vida livre, menores do que as parasitas apresentam útero desenvolvido cheio de ovos. Os machos são menores do que as fêmeas, e apresentam espículas na extremidade posterior (MORAES, 1948; GROVE, 1996). A figura 1 mostra as diversas formas do parasita com as suas dimensões.

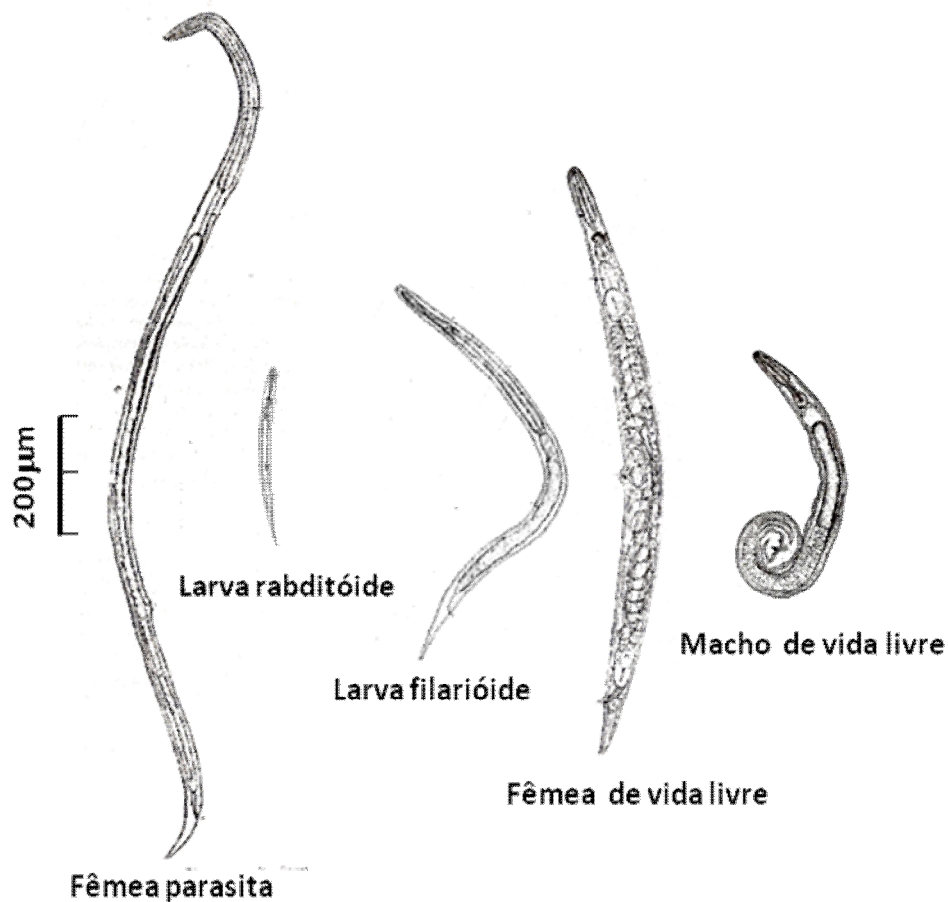


Figura 1. Formas adultas e larvais de *Strongyloides stercoralis* (copiado, com modificações, de Moraes, 1948).

2.3. O ciclo biológico de *Strongyloides stercoralis*

Strongyloides stercoralis possui uma particularidade importante que é a de realizar um duplo ciclo evolutivo, ocorrendo um no hospedeiro humano (ciclo direto ou homogônico) e o outro no solo (indireto ou heterogônico ou ciclo de vida livre).

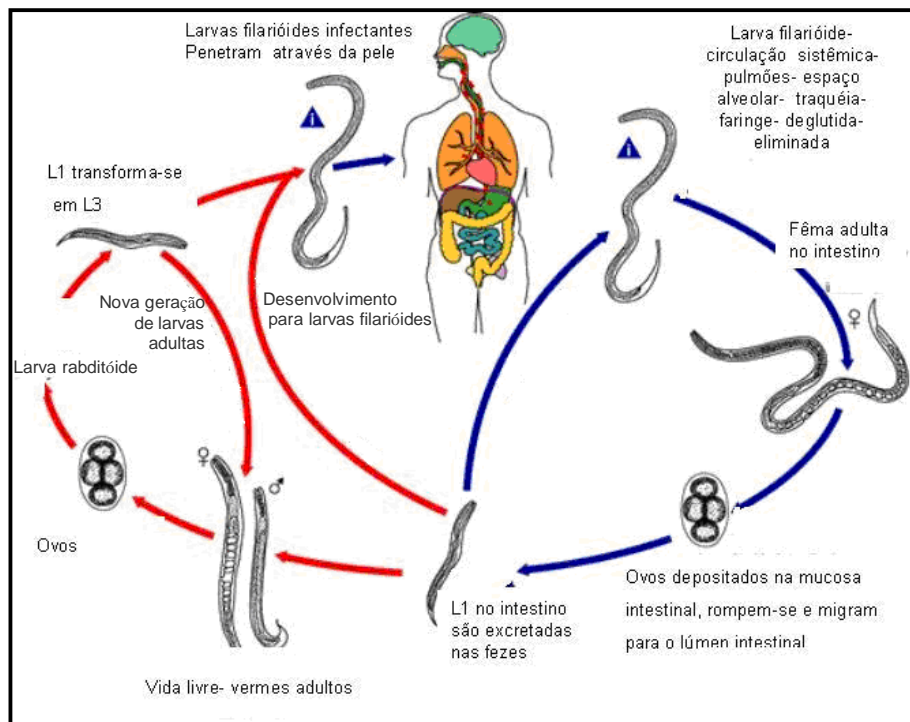


Figura 2. Representação esquemática do ciclo evolutivo de *Strongyloides stercoralis*. Copiado da Image Library na página da internet do CDC (www.cdc.gov).

As fêmeas parasitas são partenogênicas e permanecem mergulhadas nas criptas da mucosa duodenal e da porção superior do jejuno. Os ovos larvados eclodem imediatamente após a postura, ainda nas criptas duodenais, razão pela qual dificilmente são observados nas fezes. As larvas rabditóides ao saírem dos ovos, migram para a luz intestinal e podem ser eliminadas nas fezes (ciclo sexuado ou indireto) ou sofrerem diferenciação no próprio intestino (ciclo partenogênético ou direto) originando larvas filarióides infectantes, possibilitando a auto-infecção.

Ciclo partenogenético ou direto

As larvas rabditóides eliminadas nas fezes chegam ao meio exterior e em condições favoráveis de temperatura (20 a 30° C), alta umidade, ausência de luz solar direta (sombra) e de solo (areno argiloso e rico em matéria orgânica), continuam o ciclo. Em condições ambientais desfavoráveis irão morrer rapidamente ou retardar expressivamente o ciclo, especialmente sob baixas temperaturas. Essas larvas passam a se alimentar e sofrem duas ecdises. Após 24 a 36 horas se transformam em larvas filarióides infectantes. Estas não se alimentam, vivendo na dependência de reservas de glicogênio, permanecendo na superfície do solo por uma a três semanas e aguardando o momento de penetrar em algum novo hospedeiro. Por ação mecânica (movimentação) e química (melanoproteases), penetram no hospedeiro através da pele, da mucosa bucal e esofágica. Auxiliados pelas enzimas proteolíticas, atravessam os tecidos e alcançam a corrente sangüínea ou linfática, dirigindo-se para o coração e pulmões. Nos capilares pulmonares se transformam em L4, atravessam a membrana alveolar e chegam aos brônquios, de onde migram para a faringe. Nesse ponto podem ser expelidas com a secreção produzida ou ser deglutidas, deslocando-se para o intestino delgado, onde se fixam e se transformam em fêmeas partenogenéticas parasitas. Poucos dias depois elas iniciam a eliminação de larvas rabditóides pelas fezes do paciente. O tempo decorrido entre a penetração de larvas filarióides e a eliminação de larvas rabditóides varia entre 15 e 30 dias.

Ciclo sexuado ou indireto

Durante esse ciclo, quando as larvas rabditóides diplóides e haplóides encontram um ambiente adequado, irão dar continuidade ao ciclo, passam por

quatro mudas e originam respectivamente fêmeas e machos de vida livre, que se acasalam. As fêmeas fazem a postura de ovos triplóides, que darão origem a larvas rabditóides, que sofrem duas mudas e se transformam em larvas filarióides infectantes. A partir dessa fase, o ciclo é semelhante: não se alimentam, possuem sobrevida de uma a três semanas, período em que estão aptas a infectar novo hospedeiro (NEVES, 2009).

Auto-infecção

As larvas rabditóides 3n podem sofrer duas mudas e originar larvas filarióides infectantes tanto na luz intestinal como na região perianal. Essas larvas filarióides infectantes podem penetrar a mucosa intestinal ou a pele da região perianal, produzindo auto-infecção. A penetração de larvas na região perianal dá origem ao quadro clínico conhecido com o nome de “larva currens”.

2.4. Diagnóstico laboratorial da infecção com *Strongyloides stercoralis*

O diagnóstico da estrogiloidíase ainda é um desafio tanto para o médico quanto para os Patologistas Clínicos e Bioquímicos especializados em análises clínicas (DREYER, 1996). Ele ainda é feito mediante a detecção de larvas em amostras de fezes através da observação microscópica. Mais raramente o diagnóstico é feito pela detecção de larvas no escarro, em outros líquidos orgânicos e por estudo histológico em biópsias e necropsias. O diagnóstico indireto, através da pesquisa de anticorpos circulantes ou de antígenos nas fezes, tem sido utilizado, mas com ressalvas e dificuldades.

2.4.1 A identificação de larvas rabditóides de *S. stercoralis* no exame coproparasitológico

Embora seja um parasita intestinal, que elimina larvas nas fezes (raramente ovos, pois estes eclodem logo após a eliminação ainda no duodeno), os exames coproparasitológicos de rotina ainda apresentam baixa sensibilidade para a sua identificação (DREYER, 1996; DE PAULA et al., 2000; SIDDIQUI & BERK, 2001; GREINER ET al, 2008). Por outro lado, a eliminação de larvas, na maioria dos casos, é mínima e irregular, razão pela qual a multiplicidade de amostras é indispensável (GENTA et al., 1986; NEVA, 1986; LIU & WELLER, 1993; UPARANUKRAW et al., 1999; SILVA et al., 2003; DE CARLI, 2007).

Nos exames que usam sedimentação da suspensão fecal (Hoffman, Pons & Janer - HPJ) ou métodos de concentração com formol-éter, embora se faça a suspensão com 2 a 4 g de fezes, somente uma pequena parte do sedimento (geralmente 2, e menos frequentemente, 4 lâminas, com lamínula 22x36 mm) é examinada, não totalizando mais do que um volume de 100 µL de todo o sedimento. Por essa razão, três métodos foram desenvolvidos para melhorar a sensibilidade do exame: o método de Baermann-Moraes (MORAES, 1948), o método da placa de Ágar (ARAKAKI, 1988) e o método de Harada-Mori (HARADA & MORI, 1955).

Originalmente descrito por Baermann em 1917 para isolar larvas do solo e posteriormente modificado por Moraes (1948) para utilização na identificação de larvas nas fezes, o método de Baermann-Moraes se baseia no fato de que as larvas do *Strongyloides* possuem termotropismo positivo migrando para as áreas mais aquecidas.

Existem várias adaptações nos equipamentos para a realização desse método, mas de modo geral utiliza-se um funil acoplado a um tubo de borracha

fechado com uma pinça de Mohr. As fezes são colocadas em gaze ou em tela metálica de modo que possam ficar em contato com água aquecida colocada no funil. Em geral, 8 a 10 g de fezes, são colocadas sobre uma gaze dobrada que é posta em contato com água aquecida a 42° C no funil preparado como previamente descrito. As larvas vivas, devido ao termotropismo, migram para a água no funil, acumulando-se, por sedimentação espontânea, na sua parte estreita e dentro do tubo de borracha a ela acoplado. Após uma hora a uma hora e meia, as larvas são recolhidas em um tubo, após o afrouxamento da pinça de Mohr. Depois de centrifugado a baixa rotação, o sedimento é examinado entre lâmina e lamínula.

Esse exame requer duas condições importantes: que as fezes sejam frescas para que as larvas estejam vivas e que a temperatura da água seja mantida em torno de 40 graus durante o exame.

O método da placa de Ágar foi introduzido por Arakaki (1988) e modificado por Koga et al. (1991). Baseia-se no fato de que as larvas rabditóides migram facilmente no Ágar, arrastam bactérias que formam colônias marcando o seu trajeto que fica facilmente identificável.

É realizado com 3 a 4g de fezes colocadas no centro de uma placa de Petri (15 cm de diâmetro) com Ágar (Ágar 1,5%, extrato de carne 0,5%, peptona 1,0% e NaCl 0,5%). As larvas migram no Ágar e formam túneis facilmente visíveis com microscópio de dissecação devido ao crescimento das colônias bacterianas. Da mesma forma que o método de Baermann-Moraes, as fezes devem estar frescas e só há detecção de larvas vivas. O tempo para a leitura é de 24 a 48 horas após o cultivo das fezes.

O método de Harada-Mori (1955) se baseia em colocar 1 a 2 g de fezes espalhadas em 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 ou fervida, de maneira que a água não toque nas fezes. Em seguida, obtura-se o tubo com papel celofane, preso por meio de um anel de borracha, conservando-se o tubo em posição vertical durante 24 a 48 h, à temperatura ambiente (24-28°C). Por fim examina-se a água do fundo do tubo, com uma lupa, a fim de observar se existem larvas (PESSÔA & MARTINS, 1978). Esse método examina pequena quantidade de fezes e o tempo de observação (24 horas) permite que ovos de ancilostomídeos sofram eclosão, levando à necessidade de exame morfológico das larvas para sua identificação.

Esses métodos, especialmente o de Baermann-Moraes e o da placa de Ágar, realizados em três amostras fecais, melhoram muito a sensibilidade do exame coproparasitológico no diagnóstico do *S. stercoralis*, mas são mais trabalhosos, dependem de fezes frescas, recém colhidas e, especificamente o método de Koga, é mais dispendioso, dependendo de placas de Petri com gel de Ágar. A sensibilidade dos dois métodos é semelhante, maior do que a sedimentação com ou sem tratamento com formol-éter, embora alguns autores tenham relatado o método da placa de Ágar como ligeiramente menos sensível (STEINMANN, 2007; SATO, 1995; SUKHAVAT, 1994; KNOPP, 2008). Porém, outros o consideram mais sensível que o método de Baermann (SALAZAR et al., 1995).

2.4.2 Métodos indiretos de diagnóstico do *Strongyloides stercoralis*

As dificuldade encontradas na identificação das larvas nas fezes, por sua escassez ou pela flutuação na sua eliminação, fazem com que a sensibilidade dos exames coproparasitológicos não atinja 100%, mesmo com repetições. Alguns autores usando a cultura em Ágar atingiram sensibilidade de 90% examinado quatro

amostras (UPARANUKRAW et al., 1999) e 84% examinando três amostras (SATO et al., 1995). Utilizando o método de Baermann, Dreyer et al. (1996) examinando três amostras identificaram 67% dos casos. A discrepância nesses resultados é de difícil explicação já que os dois métodos se baseiam no mesmo princípio e o método de Baermann examina maior quantidade de fezes do que a cultura em placa de Ágar. Um possível fator responsável pela divergência dos resultados pode ter sido diferenças no tempo decorrido entre a colheita das amostras e a realização dos exames. Também as características da infecção nas amostras estudadas pode ter sido muito diferente, com indivíduos eliminando menos larvas no estudo de Dreyer et al.

Por essas razões, métodos indiretos de identificação do parasita têm sido tentados, incluindo: métodos para identificação de anticorpos parasita-específicos no soro e outros líquidos corpóreos, intradermoreações de resposta imediata com uso de antígenos do parasita e identificação de antígenos do parasita nas fezes por método imunológico ou por biologia molecular.

2.4.2.1 Diagnóstico imunológico da infecção com *S. stercoralis* através da pesquisa de anticorpos anti-antígenos do parasita no sangue circulante e em outros líquidos corpóreos

O diagnóstico sorológico da infecção com *S. stercoralis* tem sido feita através da pesquisa de anticorpos séricos anti-*Strongyloides* pelos métodos de ELISA, aglutinação e imunofluorescência indireta, utilizando antígenos das diversas formas do parasita.

Aglutinação de partículas sensibilizadas com antígenos do Strongyloides. Testes de hemoaglutinação indireta foram introduzidos em 1987 por

Gam et al. (1987), mas foram pouco utilizados. Sato et al. (1991) introduziram um teste de aglutinação indireta utilizando como antígeno a fração solúvel do extrato de larvas filarióides de *S. stercoralis* obtidas de cultura de fezes em papel de filtro e, como partículas aglutinantes, partículas de gelatina disponíveis no comércio. O antígeno era fixado sobre as partículas de gelatina previamente tratadas com ácido tânico. Antígeno obtido de larvas filarióides de *S. venezuelensis* tem sido também utilizado (HUAMAN et al., 2003). O método apresenta boa sensibilidade e especificidade quando comparado com o ELISA utilizando antígenos semelhantes, independente de serem de *S. stercoralis* ou *S. venezuelensis* (SATO, et al., 1991; HUAMAN et al., 2003; SITHITHAWORN et al., 2005). A especificidade foi ligeiramente maior no teste de aglutinação de partículas quando comparada com a do ELISA (SITHITHAWORN et al., 2005). Os testes de aglutinação têm sido utilizados para estudos de prevalência do parasita em algumas regiões, por serem considerados de fácil execução, mas têm sido substituídos pelo ELISA nos últimos anos.

Imunofluorescência indireta utilizando larvas vivas ou partículas de larvas de Strongyloides. A pesquisa de anticorpos anti-*S. stercoralis* pela imunofluorescência indireta foi inicialmente proposta utilizando como substrato para identificação dos anticorpos larvas vivas de *S. ratti* e do *S. stercoralis* (GROVE & BLAIR, 1981; GENTA & WEIL, 1982). A sensibilidade e especificidade foram consideradas muito boas, com ótima correlação entre os resultados obtidos com *S. ratti* e *S. stercoralis* (BOSCOLO et al., 2007). Cortes em criostato de larvas de *S. ratti* e *S. stercoralis* podem ser utilizados, mantendo sensibilidade e especificidade acima de 90 % (COSTA-CRUZ et al., 1997). Imunofluorescência indireta pode também ser feita com partículas obtidas de larvas filarióides do *S. venezuelensis* liofilizadas e

fixadas em lâminas com verniz, com sensibilidade e especificidade semelhantes às observadas com larvas cortadas no criostato (MACHADO et al., 2001). A comparação da imunofluorescência indireta com ELISA ou aglutinação de partículas de gelatina mostrou sensibilidade e especificidade semelhantes às observadas com esses métodos (CARROL et al., 1981; KOOSHA, 2004; MOTA-FERREIRA et al., 2009). A imunofluorescência indireta se mostrou de boa sensibilidade e especificidade para identificação de IgA e IgG no leite e no soro de mulheres infectadas com *S. stercoralis* (MOTA-FERREIRA et al., 2009).

ELISA utilizando diferentes antígenos de *Strongyloides*. O teste ELISA para diagnóstico de *S. stercoralis* vem sendo realizado desde a década de 1980. Os antígenos utilizados têm sido de larvas filarióides de *S. stercoralis*, *S. ratti* ou *S. venezuelensis* e, menos freqüentemente, de larvas rabditóides de *S. stercoralis*. Frações solúveis obtidas de larvas filarióides (sobrenadante de extratos brutos dessas larvas) de *S. stercoralis* (NEVA et al., 1981; SATO et al., 1985; GAM et al., 1987; MANGALLI et al., 1991), *S. ratti* (CARROL et al., 1981; NEVA et al., 1981; GAM et al., 1987; RODRIGUES et al., 2007) ou *S. venezuelensis* (MACHADO et al., 2008) têm sido utilizadas como antígenos para sensibilizar as placas. Alguns autores modificaram a solubilização do extrato bruto de larvas filarióides ou do *S. stercoralis* ou do *S. venezuelensis*, tentando: (a) facilitar a extração, utilizando meio alcalino (MACHADO et al., 2003), (b) aumentar a quantidade de antígeno extraído solubilizando o extrato bruto em tampão com uréia (ROSSI et al., 1993), (c) fracionar o antígeno e utilizar frações com peso molecular abaixo de 30KD (DEKUMYOY et al., 2002) e (d) utilizar detergentes para separar frações hidrofóbicas (FELICIANO et al., 2010). As diferentes manipulações mostraram pequenas vantagens em relação à

utilização de antígenos solúveis de extratos brutos, com pequeno aumento na especificidade.

Testes ELISA têm sido utilizados para identificação de isotipos de anticorpos que reconhecem epítomos do parasita, especialmente para detecção dos diferentes tipos de IgG (IgG1, IgG3 e IgG4), de IgE e IgA (COSTA-CRUZ et al., 2003; RODRIGUES et al., 2007; RIBEIRO et al., 2010).

Anticorpos anti-*Strongyloides* têm sido também detectados no leite materno e na saliva utilizando ELISA com antígenos heterólogos. A pesquisa de IgG e IgA parasita-específicos na saliva, utilizando fração hidrofóbica de extrato de larvas de *S. venezuelensis* mostrou boas sensibilidade e especificidade, melhores do que com a utilização da fração solúvel do mesmo extrato (RIBEIRO et al., 2010).

Antígenos recombinantes do *Strongyloides* para melhorar a especificidade dos testes ELISA. Antígenos recombinantes produzidos a partir de DNA complementar de bibliotecas formadas a partir de larvas filarióides de *S. stercoralis* têm sido obtidos, mostrando reatividade semelhante ou melhor do que os antígenos somáticos das larvas, sendo alguns bem mais específicos. Alguns peptídeos recombinantes, ricos em prolina, têm mostrado alta especificidade, sendo reconhecidos por anticorpos IgG4 e IgE, sem reação cruzada com outros helmintos (RAMACHANDRAN et al., 1998). Um desses antígenos recombinantes, reconhecido por IgE com alta especificidade, foi proposto para ser utilizado em testes intradérmicos de resposta imediata para diagnóstico de infecção com *S. stercoralis*, já que não induziu reação positiva em pessoas não infectadas (RAVI et al., 2002). O uso de um desses antígenos recombinantes em uma investigação epidemiológica em região endêmica para *S. stercoralis* na Argentina, mostrou que uma fração de 31 KD, denominada NIE, demonstrou sensibilidade e especificidade muito altas, sem

reação cruzada com soros de pacientes portadores de outras parasitoses intestinais. O teste utilizando o Ag NIE no ELISA e, especialmente no método LIPS (Luciferase ImmunoPrecipitation System assay) mostrou ser útil para investigar a parasitose, independente da existência ou não de outras helmintíases endêmicas (KROLEWIECKI et al., 2010). Outro antígeno recombinante recentemente isolado foi uma strongilostatina de larvas filarióides do *S. stercoralis* que é especificamente reconhecida por IgE anti-*Strongyloides* e não por IgE anti-outros helmintos (VARATHARAJALU et al., 2011).

Outros antígenos obtidos de larvas de Strongyloides, possivelmente úteis em diagnósticos imunológicos do parasita. Antígenos de superfície e de secreção e excreção de larvas filariformes de *S. stercoralis* têm sido também obtidos, com finalidade de obter frações reconhecidas por anticorpos citotrópicos, para serem utilizadas em testes intradêmicos para diagnóstico de infecção com *S. stercoralis* (BRINDLEY et al., 1988).

Western blot na identificação de frações antigênicas mais específicas dos antígenos solúveis de larvas do Strongyloides. O uso do western blot, utilizando as frações solúveis de larvas filarióides contra soro de pacientes com o parasita, tem identificado frações que são mais especificamente reconhecidas pelas imunoglobulinas parasita-específicas produzidas pelo hospedeiro. Frações de 41, 31 e 28 KD de *S. stercoralis* foram melhor reconhecidas por soros (IgG) de pacientes com o parasita ou com suspeita de ter o parasita (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). Utilizando extrato de larvas filarióides de *S. rattii*, Silva et al. (2003) encontraram 11 frações entre 10 e 138 KD predominantemente reconhecidas pelos soros de pacientes com

S. stercoralis, concluindo os autores que os extratos dessa espécie podem ser utilizados para Western blot confirmatório da infecção com *Strongyloides stercoralis*.

A utilização do Western blot para identificação de frações antigênicas mais especificamente reconhecidas por determinado isotipo de anticorpo, tem mostrado que algumas frações são mais especificamente reconhecidas por IgA ou IgE anti-*S. stercoralis*, permitindo a avaliação específica desses anticorpos nos pacientes infectados. Quinze frações do *S. ratti* foram reconhecidas com frequência entre 8 a 46% por soros de pacientes infectados com *S. stercoralis* e apenas duas reconhecidas por soros de pacientes com outras helmintíases intestinais; as frações mais reconhecidas por IgE parasita-específica foram as de 70, 63, 61, 44 e 7 KDa (RODRIGUES et al., 2004). Utilizando soros de pacientes com teste ELISA positivo para *S. stercoralis* que eliminavam larvas nas fezes e de pacientes com teste ELISA positivo, mas que não tinham larvas detectadas nas fezes, Atkins et al. (1999) mostraram que a presença de IgA que reconhecia cinco frações do antígeno das larvas filarióides, se relacionava com a não detecção das larvas rabbitóides nas fezes.

2.4.2.2 A especificidade nos testes para pesquisa de anticorpos anti-*Strongyloides* utilizando os antígenos obtidos de larvas de *S. stercoralis*, *S. ratti* ou *S. venezuelensis*

Os testes ELISA, de aglutinação indireta ou imunofluorescência indireta apresentam problemas das reações cruzadas com anticorpos induzidos por outros helmintos. A sensibilidade e a especificidade observadas nas publicações sobre esses testes são altas, mas em muitos casos obtidas em estudos em regiões onde as helmintíases intestinais são pouco prevalentes. Em estudo recente realizado na

França, o uso de ELISA com os antígenos obtidos de forma convencional, em amostra que tinha 57 pacientes com *Strongyloides stercoralis*, 46 com outros helmintos intestinais e 54 com eosinofilia sem diagnóstico de doença parasitária, observou-se sensibilidade de 91,2% e especificidade de 93,3% com valor preditivo negativo de 99,9% (BON et al., 2010). No entanto as reações cruzadas com outros parasitas intestinais existem, e a melhora da especificidade, sem aparente alteração na sensibilidade, é conseguida pela adsorção dos soros com antígenos de outros helmintos intestinais (LINDO et al., 1994; CONWAY et al., 1993). O desenvolvimento recente dos antígenos recombinantes tende a melhorar sensivelmente a especificidade desses testes.

Um resultado positivo de um teste sorológico para *Strongyloides stercoralis*, com utilização dos antígenos convencionais, pode significar: (a) presença do parasita (confirmada pelo exame parasitológico), (b) presença do parasita, não confirmado no exame parasitológico devido à flutuação na eliminação de larvas, (c) contato prévio seguido de eliminação do parasita (cicatriz sorológica) ou reação cruzada por anticorpos produzidos por outros helmintos. Por essa razão a utilidade dos testes no diagnóstico do parasita é limitada. No entanto esses testes são muito úteis para: (a) inquéritos epidemiológicos; (b) avaliar a terapêutica; (c) incrementar a avaliação coparassitológica em situações especiais.

Para inquéritos epidemiológicos, uma primeira fase pode ser feita utilizando ELISA ou aglutinação indireta para selecionar os indivíduos com anticorpos anti-*Strongyloides*; nesses será realizado exame parasitológico, com técnicas sensíveis para detectar as larvas rhabditóides e confirmar a presença do parasita. Inquéritos epidemiológicos têm sido feitos com utilização ou de ELISA ou de aglutinação, mostrando geralmente prevalências maiores do que as observadas com a

investigação somente pelo exame parasitológico (SATO et al., 1990 e 1991; SATO et al, 1995; SITHITHAWORN et al., 2003; SOUZA-FIGUEIREDO et al., 2010).

Alguns autores têm relatado que os exames sorológicos, especialmente ELISA e aglutinação indireta, são úteis para avaliar a eficácia da terapêutica. Demonstram que os títulos dos anticorpos caem quando o parasita é erradicado. Nos pacientes tratados que mantêm títulos elevados (semelhantes aos da época do diagnóstico) frequentemente se demonstra a presença das larvas nas fezes, indicando a falha terapêutica (KOBAYASHI et al., 1994; SATO et al., 1995; LOUFTY et al., 2002).

Em situações especiais, como o risco de imunossupressão que pode induzir forma grave da doença, o exame parasitológico deve ser realizado primeiro e se negativo, pode ser feito um teste sorológico, que se positivo, deve ser seguido de uma avaliação coproparasitológica cuidadosa para se tentar a identificação de larvas nas fezes (SATO et al.,1995).

2.4.2.3 Testes intradérmicos no diagnóstico de infecção com o *Strongyloides stercoralis*

Testes de reação cutânea imediata após injeção intradérmica de antígenos de *Strongyloides* têm sido estudados há décadas, sendo os primeiros testes feitos por Brannon e Faust em 1949 utilizando extratos de larvas de *S. fuelleborni*. SATO et al. (1986) utilizaram antígenos de secreção/excreção de larvas filarióides e encontraram reação positiva em 82% de pacientes com a infecção comprovada e em 52% em pacientes com infecção no passado e em 10% dos pacientes sem infecção atual ou passada. Admitiram que o teste pode ser útil no auxílio do diagnóstico da parasitose.

Neva et al. (2001), utilizaram antígenos somáticos e de secreção/excreção de larvas filarióides de *S. stercoralis* e observaram entre 82 e 100% de reações positivas em pacientes com infecção comprovada, no entanto, especialmente para os antígenos somáticos houve reação cruzada em pacientes infectados com diferentes filárias. Os autores discutem a possibilidade de melhora desses testes com a utilização de antígenos recombinantes, mais especificamente reconhecidos por IgE. Em pacientes com *Strongyloides stercoralis* superinfectados com HTLV-1 a positividade do teste intradérmico foi bem menor, fato confirmado posteriormente por outros investigadores (PORTO et al., 2001).

2.4.2.4 Detecção de antígenos do *S. stercoralis* nas fezes por métodos imunológicos ou por métodos de biologia molecular

Anticorpos monoclonais ou policlonais têm sido utilizados na tentativa de detectar antígenos do *S. stercoralis* nas fezes, facilitando a identificação do parasita naqueles casos onde a eliminação de larvas é pequena. Recentemente El-Baddry (2009) utilizou um soro policlonal de coelho imunizado com antígenos de secreção/excreção de vermes adultos para realizar um teste ELISA sanduíche (captura), mostrando que o mesmo teve alta especificidade para reconhecer copro-antígenos do *S. stercoralis*, em relação à coproantígenos encontrados em pacientes com *S. mansoni*, *Fasciola gigantica* e *Capillaria philipinensis*.

A utilização da reação de polimerase em cadeia (PCR) vem sendo progressivamente utilizada para o diagnóstico de parasitoses intestinais através da detecção de DNA dos parasitas nas fezes. PCR em tempo real mostrou boas especificidade e sensibilidade para identificar *S. stercoralis* (VERWEIJ et al., 2009; KRAMME, 2010). PCR com múltiplas sondas (PCR multiplex) está também sendo

investigado para a pesquisa simultânea de vários helmintos intestinais (*Ancylostoma*, *Necator americanus*, *Ascaris lumbricoides* e *Strongyloides stercoralis*), com resultados mostrando altas sensibilidade e especificidade (BASUNI et al., 2011). Esses métodos, no momento muito dispendiosos, poderão no futuro, ter o custo reduzido e a execução facilitada, sendo candidatos a substituir o exame coproparasitológico tradicional.

Como pode ser observado dos dados da literatura, o diagnóstico do *Strongyloides stercoralis* ainda apresenta problemas especialmente nos pacientes com baixa eliminação de larvas. Embora métodos mais sofisticados para identificar antígenos ou DNA do parasita nas fezes estejam em desenvolvimento, o método coproparasitológico é ainda o mais simples, de mais baixo custo e realizado em qualquer laboratório de Análises Clínicas. Por essas razões é sempre interessante introduzir métodos ou modificações em métodos coproparasitológicos que possam melhorar a sua sensibilidade. Com essa intenção levantamos a hipótese de que o exame de todo o sedimento obtido de uma amostra considerável de fezes pode aumentar a sensibilidade na identificação das larvas. Para testar essa hipótese propusemos a utilização de um microscópio invertido para examinar de uma só vez em uma câmara especial todo o sedimento obtido a partir de 10 ou mais gramas de fezes e a avaliação dessa utilização em laboratórios de rotina, comparando com o HPJ e com métodos de Baermann-Moraes, mais sensível na detecção das larvas do parasito.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar uma metodologia de diagnóstico de larvas de *S. stercoralis* a partir da sedimentação espontânea de fezes, examinando todo o sedimento ao microscópio invertido.

Objetivo Específico

Comparar a metodologia proposta na qual examina todo o sedimento ao microscópio invertido a partir da sedimentação espontânea de fezes, com o método de Hoffman, Pons e Janer e com o método de Baermann-Moraes, considerado de alta sensibilidade para diagnóstico de larvas de *S. stercoralis*.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Utilização do microscópio invertido para identificação de larvas do *S. stercoralis* no sedimento obtido por sedimentação espontânea

Obtenção do sedimento. As fezes frescas contidas no recipiente de coleta eram pesadas e em seguida homogeneizadas com água de torneira no próprio recipiente. Em seguida o homogenado era passado através de gaze dobrada (tamisação), em cálice de sedimentação de vidro (250ml) de modo semelhante ao utilizado para o método de Hoffman, Pons & Janer. Após sedimentação por uma hora, se a quantidade de fezes era grande (acima de 20g) ou de consistência mais pastosa, era feita uma nova sedimentação, acrescentando-se água de torneira no sedimento.

Após a segunda sedimentação, se ela foi necessária, o sedimento obtido (com volume em torno de 15 ml) era colocado em câmara especial para observação ao microscópio invertido.

Câmara utilizada para observação do sedimento. Inicialmente as primeiras amostras eram examinadas em frascos de cultura de células, do tipo descartável, para verificar a viabilidade da observação, sem riscos de contaminação ou de exalação de odores, já que esses frascos possuem tampa de rosca. Posteriormente, foi construída uma câmara de vidro tomando-se uma placa de vidro de 3mm de espessura medindo 12 x 8 cm (tamanho aproximado do frasco de cultura), sobre o qual eram coladas, com cola de silicone, tiras de vidro de 7mm de espessura medindo 12 x 0,5 cm (tiras longitudinais) e 7 x 0,5 cm (tiras transversais). Outra placa de vidro de 3 mm de espessura, medindo 12x8cm era utilizado para cobrir a câmara. A câmara possui área livre 110x70 mm (descontando as paredes), totalizando 7700 mm². O campo microscópico com objetiva de 4x e ocular de 10x possui 5mm de diâmetro com área total de 19,7 mm². Desse modo, com a objetiva

de menor aumento são examinados aproximadamente 385 campos microscópicos, o que era feito em média em 15 minutos.

A Figura 3 mostra o frasco de cultura e os detalhes da câmara. Essa câmara, com dimensões semelhantes à dos frascos de cultura se adapta muito bem à platina do microscópio invertido.

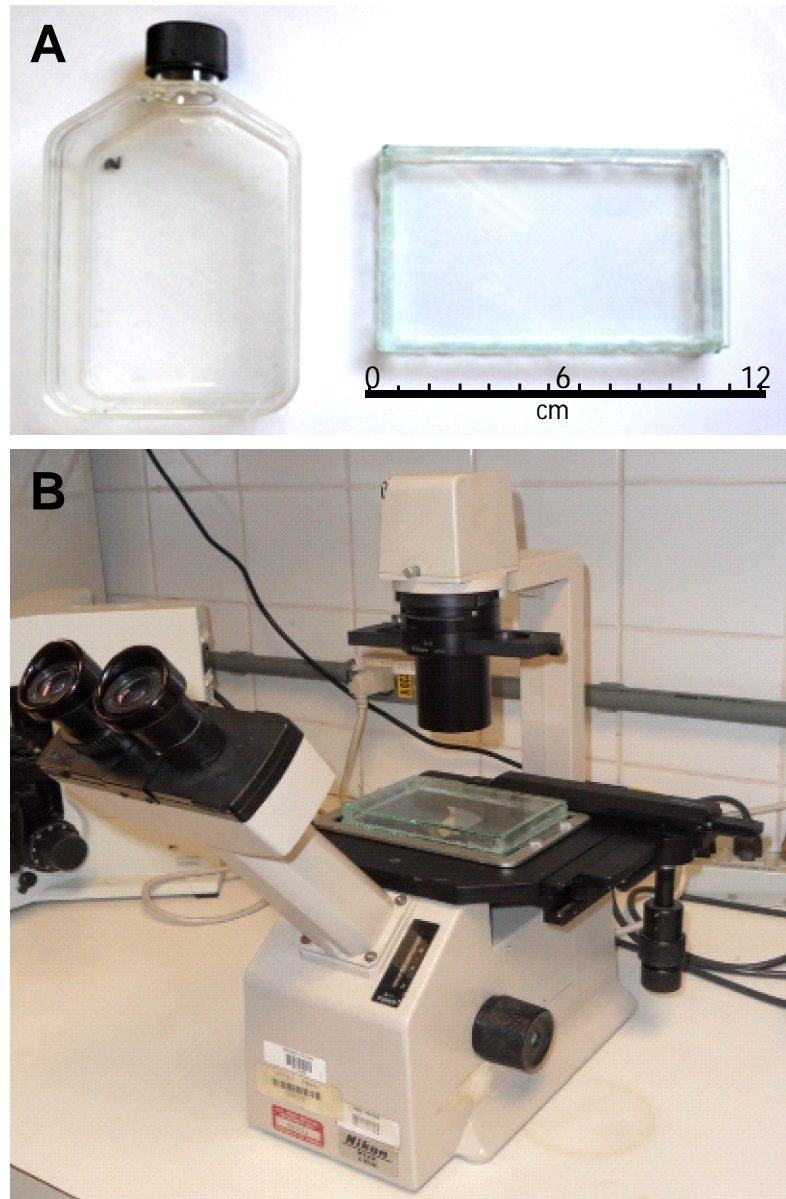


Figura 3. **A-** Frasco descartável de cultivo celular que serviu de modelo para construção da câmara de vidro para exame do sedimento fecal com microscópio invertido. **B-** Microscópio invertido utilizado no exame do sedimento fecal com a câmara inserida na platina.

Microscópio invertido utilizado. Foi utilizado um microscópio invertido, marca NIKON, equipado com ocular de 10X e objetivas de 4X, 10X e 20X.

Observação do sedimento. O sedimento era acrescido de duas ou três gotas de lugol e colocado na câmara e após cinco minutos era iniciada a observação com objetiva inicialmente de 4X e quando se suspeitava da presença de estrutura semelhante à larva rabditóide era feita a confirmação como as objetivas de 10 e 20X. Na maioria das vezes os aspectos morfológicos das larvas eram muito bem observados com ampliação de 20X.

4.2. Avaliação da eficácia do método para identificação das larvas rabditóides de *S. stercoralis* utilizando o microscópio invertido

Para avaliar a eficácia da técnica proposta, foram realizadas duas observações experimentais:

- a) Utilização da técnica em laboratório de rotina que realizava os exames coproparasitológicos pelo método de Hoffman, Pons & Janer;
- b) Realização simultânea, na mesma amostra, do método proposto e do método de Baermann-Moraes, para comparação.

Utilização da técnica em laboratório de rotina que realiza o exame coproparasitológico pelo método de HPJ. Para essa observação a técnica foi realizada nos laboratórios de rotina do Hospital Cassiano Antônio de Moraes – HUCAM - e do Hospital Fundação Concórdia, de Santa Maria de Jetibá.

Nesses laboratórios, após a concordância dos responsáveis, incluindo os técnicos de nível superior e médio, as fezes recebidas, independente da quantidade de fezes nas amostras contidas no recipiente ou da utilização ou não de líquidos conservantes, foram utilizadas, simultaneamente, para realizar o HPJ (em torno de

3g a 5g) e o restante foi utilizado para obtenção do sedimento para análise no microscópio invertido.

O método de HPJ era realizado no Laboratório do HUCAM e no laboratório do Hospital da Fundação Concórdia, de Santa Maria de Jetibá, como descrito em manuais técnicos para realização de exames coproparasitológicos, com pequenas modificações. Resumidamente, três a cinco gramas de fezes frescas, eram colocadas em recipiente de 50 ml, as quais se acrescentava água para homogeneização vigorosa com um bastão de vidro. A suspensão obtida era filtrada através de gaze dobrada em quatro, em tecido de náilon em cálice de sedimentação cônico de 250ml, acrescentando-se cerca 100 ml de água de torneira. A suspensão era deixada em repouso por no mínimo uma hora (NEVES, 2009).

Uma gota do sedimento era colocada sobre lâmina com auxílio de um canudo de refrigerante e coberta com lamínula. Eram preparadas duas lâminas que eram examinadas pelos técnicos responsáveis do laboratório.

Para exame ao microscópio invertido era utilizado todo o restante das fezes, que eram pesadas e homogeneizadas como descrito anteriormente.

Amostras examinadas simultaneamente no laboratório de rotina do HUCAM. Foram examinadas 221 amostras de fezes de pacientes atendidos nos ambulatórios do HUCAM ou internados nas enfermarias, sem qualquer tipo de escolha.

Amostras examinadas simultaneamente no laboratório de rotina do laboratório do Hospital da Fundação Concórdia, de Santa Maria de Jetibá. Foram avaliadas simultaneamente 102 amostras consecutivas de pacientes atendidos nos ambulatórios da fundação.

Realização simultânea, na mesma amostra, do método proposto e do método de Baermann-Moraes, para comparação. Para realizar o método Baermann-Moraes, foi utilizado o aparato de Baermann-Moraes (suporte, funil de vidro, pinça de Mohr, gaze, tubos cônicos, centrífuga) e o exame, feito à temperatura ambiente. Para execução, o funil de vidro foi preenchido com água a 45°C. A pinça de Mohr foi aberta com o objetivo de deixar escorrer uma pequena quantidade 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 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. O conjunto foi deixado em repouso durante 60 minutos e, após esse tempo, todo líquido foi coletado em tubo cônico Falcon® de 15 ml e centrifugado a 1500 rpm durante um minuto. O sedimento foi recolhido (mesmo quando não havia formação de sedimento visível a olho nu) e três lâminas foram observadas a microscópio óptico com objetiva no aumento de 10x (PESSÔA & MARTINS, 1978).

As amostras para realização do Baermann-Moraes e o exame do sedimento ao microscópio invertido, simultaneamente, foram obtidas de pacientes atendidos no HUCAM, que entregavam fezes colhidas no dia. Após a retirada da amostra para o Baermann-Moraes (10g), outras 10g eram utilizadas para sedimentação espontânea e observadas com o microscópio invertido.

O método de Baermann-Moraes foi realizado no laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia do Centro de Ciências da Saúde da UFES.

O projeto, intitulado “Diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* a partir da análise de sedimento obtido com dez ou mais gramas de fezes: proposta de um método

com uso de microscópio invertido” foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Espírito Santo (número 220/10).

As análises estatísticas, quando necessárias, foram realizadas com a utilização do SPSS versão 11.5 para Windows.

RESULTADOS

5.1. A execução da técnica para observação do sedimento com a utilização do microscópio invertido

A quantidade de fezes utilizada para a obtenção do sedimento foi muito variável. Inicialmente foram examinadas amostras com 10, 20, 30, 40 e 50 gramas para verificar a viabilidade de examinar todo o sedimento. A quantidade de sedimento examinado era semelhante no volume, independentemente da quantidade de fezes, com o volume ficando em torno de 15 mL e a observação ao microscópio invertido era sempre possível mesmo em sedimentos obtidos com as 50 gramas de fezes. A observação era melhor com quantidades de fezes variando entre 10 e 30 gramas.

A observação no menor aumento mostrava o sedimento com grande quantidade de partículas representadas por fragmentos de alimentos não completamente digeridos e cristais de diversas naturezas, referidos genericamente como debris, também observados no exame do sedimento quando se realiza o HPJ. No entanto, apesar dos debris observados, já com a objetiva de 4X era possível identificar as larvas o que era muito fácil quando eram móveis (Figura 4). No entanto, as larvas mortas eram também facilmente identificáveis. Na maioria das vezes o exame microscópico foi feito no primeiro sedimento, sendo pouco freqüente o uso de duas lavagens.

Ao observar as larvas, fazia-se a sua identificação com a objetiva de 20X que permitia a visualização das características morfológicas das mesmas rabditóides (bulbo do esôfago, tubérculo genital e extremidade rombóide da cauda) que permitia a diferenciação com larvas de ancilostomídeos. Quando as larvas eram móveis, eram mais facilmente identificadas pelo movimento ondulatório, típico de larvas rabditóides do *Strongyloides*. Se necessário as larvas podiam ser colhidas com

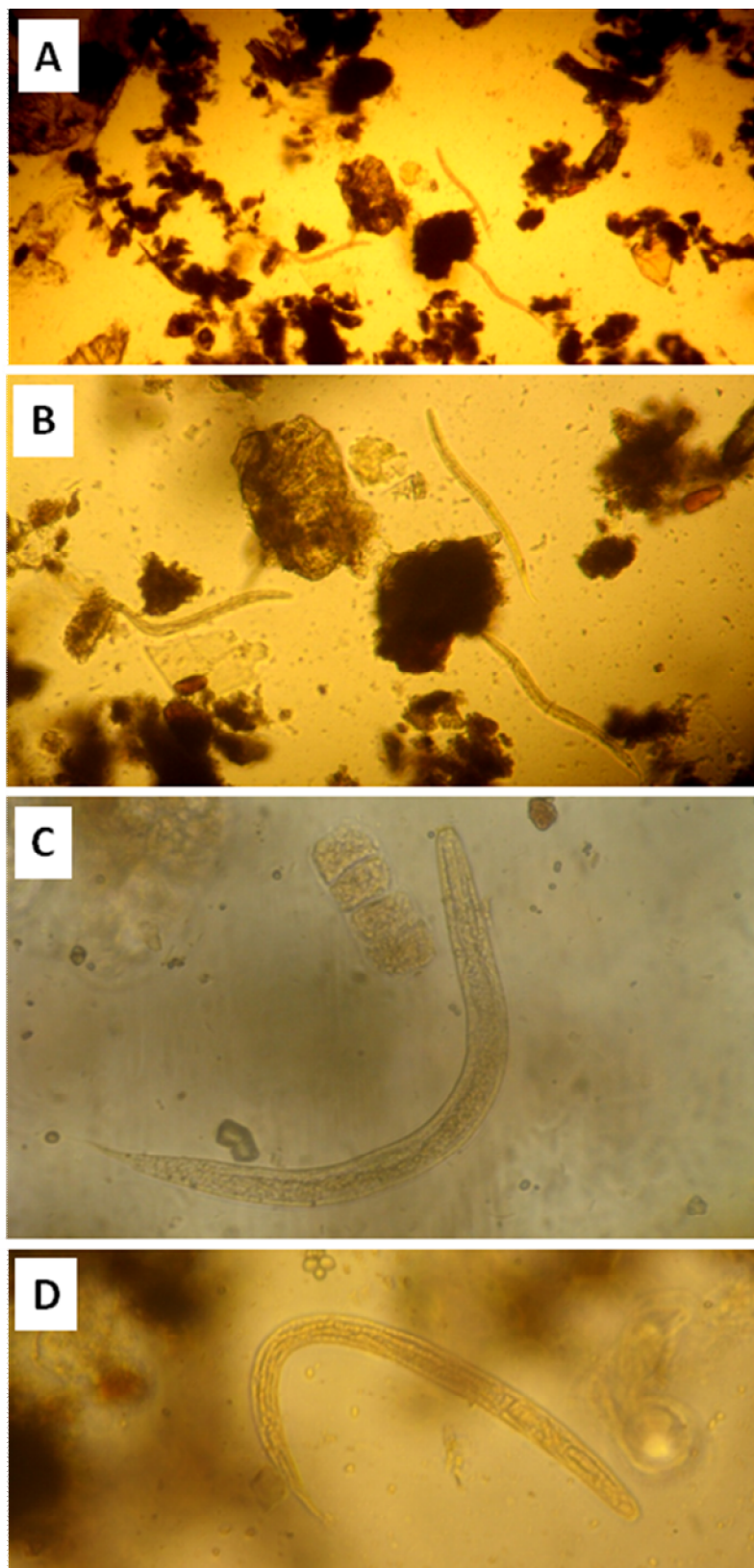


Figura 4. Fotomicrografias do sedimento examinado com o microscópio invertido mostrando campos com larvas rhabditóides vistas com objetiva de 4x(A), 10x(B) e 20x(C e D).

pipeta de Pasteur diretamente da câmara, coradas com lugol e examinadas entre lâmina e lamínula no microscópio convencional.

5.2. Resultados observados com a utilização do microscópio invertido em laboratórios de rotina que realizam somente o HPJ

Nos 221 exames realizados no laboratório do HUCAM, nos quais foram realizados o HPJ e o exame com o microscópio invertido a quantidade de fezes variou entre 10 e 59 gramas com média de 20,3 e mediana de 19 gramas (Anexo 1). Os dados sobre idade e sexo dos pacientes que forneceram as amostras estão no anexo 1.

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos na pesquisa de larvas rabditóides no HPJ e na observação de todo o sedimento com o microscópio invertido. Como pode ser visto, o HPJ de rotina identificou larvas rabditóides em 9 das 221 amostras (4,07%) enquanto que o exame de todo o sedimento no microscópio invertido identificou em 20 amostras (9,05%), totalizando 11 casos que não haviam sido identificados no HPJ. A freqüência observada com o HPJ ficou dentro dos valores de freqüência do *S. stercoralis* observados no laboratório do HUCAM (4,5 % em pacientes adultos, freqüência encontrada por Marques et al. (2010), no mesmo Hospital). O cálculo do índice de concordância entre os dois métodos mostrou resultado muito baixo (valor de $\kappa= 0,598$), considerado como indicador de uma concordância apenas regular. O uso do microscópio invertido no exame de todo o sedimento aumentou a sensibilidade em 122%.

Tabela 1. Comparação dos resultados obtidos na pesquisa de larvas rabditóides de *S. stercoralis* utilizando o método de Hoffman, Pons & Janer da rotina do laboratório e a observação de todo o sedimento obtido por sedimentação espontânea, com o uso do microscópio invertido.

Métodos	Hoffman, Pons & Janer		Totais
Microscópio Invertido	Positivo	Negativo	
positivo	9 (4,07%)	11	20 (9,05%)
negativo	0	201	201
Totais	9	212	221

Índice de concordância $\kappa = 0,598$ (DP=0,108); $p=0,000$

No laboratório de rotina do Hospital da Fundação Concórdia, de Santa Maria de Jetibá, foram examinadas 102 amostras das quais 10 foram positivas pelo exame do sedimento no microscópio invertido (9,9%), frequência de exames positivos para *Strongyloides* muito superior à observada na rotina desse laboratório (em torno de 2% dos casos examinados nos seis meses que antecederam o período em que realizamos o exame de todo o sedimento com o microscópio invertido). A idade e gênero dos pacientes cujas amostras foram analisadas estão no anexo 2.

5.3. Resultados do exame feito com o microscópio invertido e com o método de Baermann-Moraes, nas mesmas amostras

Foram avaliadas 112 amostras de fezes frescas, com quantidade que permitia a realização do Baermann-Moraes com 10g e da sedimentação espontânea também com 10 g. A tabela 2 resume os resultados dessa observação. Das 112 amostras, 11 foram positivas no Baermann-Moraes e as mesmas foram também positivas no exame ao microscópio invertido. O índice de concordância kappa foi igual a 1, com 100% de concordância entre os dois métodos. É interessante observar que a prevalência observada de casos positivos para *Strongyloides stercoralis* de exames

positivos (9,82%) foi semelhante à observada no laboratório de rotina do HUCAM, com o uso do microscópio invertido (9,05%).

Tabela 2. Comparação dos resultados obtidos na pesquisa de larvas rabsitóides de *S. stercoralis* utilizando o método de Baermann-Moraes e a observação de todo o sedimento obtido por sedimentação espontânea, utilizando o microscópio invertido.

Métodos	Baermann-Moraes		Totais
	Positivo	Negativo	
Microscópio Invertido			
positivo	11	0	11
negativo	0	101	101
Totais	11	101	112

Índice de concordância $\kappa= 1,00$

Nos casos positivos para larvas de *S. stercoralis*, estas eram contadas. O resultado da contagem se encontra na tabela 3. De modo geral o número de larvas observadas no Baermann-Moraes era maior do que no microscópio invertido, embora um teste de t pareado não tenha mostrado significância na diferença.

Tabela 3. Número de larvas contadas no método de Baermann-Moraes e no exame de todo o sedimento com o microscópio invertido.

Amostra	Número de larvas	
	Baermann-Moraes	Microscópio invertido
1	11	6
2	344	398
3	132	358
4	2666	497
5	765	287
6	14	13
7	21	38
8	17	43
9	321	127
10	26	35
11	nd	nd

5.4. Avaliação do sedimento obtido de fezes preservadas com formol tamponado ou com solução de mertiolate, formol e iodo (MIF)

Foram examinadas amostras de fezes preservadas, nas quais se demonstrou previamente, quando frescas, a presença das larvas pelo Baermann-Moraes. A fixação com formol 4% tamponado não modificou a observação das larvas que eram facilmente identificadas. Da mesma forma, a utilização do MIF na preservação de fezes encaminhadas aos laboratório de rotina do HUCAM não alterou a observação das larvas.

DISCUSSÃO

O método de sedimentação espontânea seguida do exame em microscópio invertido, examinando todo o sedimento, é de fácil execução, consumindo um tempo semelhante ao da realização de um HPJ de rotina. Para realizar a sedimentação são utilizados os mesmos materiais do HPJ de rotina e o exame da câmara com a objetiva de 5X consome no máximo 15 minutos, tempo necessário para o resultado negativo. As larvas são facilmente identificáveis, mesmo nos sedimentos com maior quantidade de debris. O único equipamento necessário é o microscópio invertido, dos utilizados para examinar frascos de cultura. Embora seja um microscópio especial, o seu custo é semelhante aos microscópios usados nos laboratórios de rotina.

Os resultados da comparação do exame do sedimento no microscópio invertido com o realizado com o método de Baermann-Moraes mostrou concordância de 100%. O método de Baermann-Moraes é considerado um dos mais sensíveis para identificação de larvas rabditóides do *S. stercoralis*, embora a sensibilidade em identificar casos positivos varie com o número de amostras examinadas. No estudo aqui realizado, havia interesse em comparar o exame feito pelos dois métodos na mesma amostra, pois o alvo era verificar a capacidade de cada método em identificar as larvas em uma determinada amostra. Assim considerando, na comparação aqui apresentada, o exame de todo o sedimento obtido tem a mesma sensibilidade do Baermann-Moraes na identificação de larvas rabditóides em uma determinada amostra de fezes.

O exame de todo o sedimento com o microscópio invertido tem, sobre o método de Baermann-Moraes vantagem de poder ser realizado com fezes preservadas com os fixadores habituais (formol tamponado ou MIF). De fato, amostras positivas no Baermann-Moraes eram fixadas com formol tamponado a 4%

e posteriormente examinadas com o microscópio invertido e as larvas mortas eram facilmente observadas. De modo semelhante larvas em fezes preservadas com MIF eram também facilmente identificadas.

Por outro lado a sedimentação é precedida pela tamisação em gaze dobrada. Anamart et al., (2010) demonstraram que um número grande de larvas pode ficar retida nas malhas da gaze dobrada, razão pela qual propuseram a utilização de tela metálica com malha de 1,2 mm para fazer a tamisação. Demonstraram, comparando a tamisação em gaze dobrada com a feita com tela metálica, que a recuperação de larvas é significativamente maior quando se utilizou a tela metálica. Não fizemos uma observação comparativa, mas verificamos que o uso de uma peneira de nylon pequena, embora possa reter larvas, retém em menor quantidade do que a gaze dobrada utilizada no processo de tamisação. Por essa razão, sugere-se que a tamisação seja feita utilizando essas peneiras domésticas de nylon com malha de 1 x 1 mm. Essas pequenas peneiras são feitas em material plástico, que suportam lavagem em soluções concentradas de hipoclorito, sendo facilmente esterilizáveis, podendo ser reutilizadas.

Quanto ao número de larvas observadas por amostra examinada nos dois métodos, de modo geral no método de Baermann-Moraes foram contadas mais larvas do que no exame do sedimento com o microscópio invertido. Isso provavelmente está relacionado ao fato de a tamisação na gaze reter grande número de larvas como, demonstraram Anamart et al. (2010).

Comparado com o HPJ realizado na rotina dos laboratórios do HUCAM e da Fundação Hospitalar de Santa Maria do Jetibá, a utilização do exame de todo o sedimento com o microscópio invertido, incrementou o diagnóstico de larvas do *Strongyloides* em no mínimo 120%. Considerando que esse método pode ser feito

com fezes preservadas e cuja sensibilidade é comparável ao método de Baermann-Moraes, pode-se recomendá-lo nos laboratórios de rotina, em substituição a este método ou outros mais trabalhosos como a cultura em placa de Ágar.

Em resumo os resultados demonstram que para a identificação de larvas do *Strongyloides stercoralis* todo o sedimento obtido a partir de 10 ou mais gramas de fezes pode ser examinado em um única câmara, utilizando um microscópio invertido, permitindo a identificação das larvas com sensibilidade semelhante à do método de Baermann-Moraes.

CONCLUSÃO

1- O uso do microscópio invertido permite a identificação de larvas do *Strongyloides stercoralis*, examinando em câmara de vidro, de uma só vez, todo o sedimento obtido de dez ou mais gramas de fezes, após sedimentação espontânea em cálice cônico utilizado na rotina de exame coproparasitológico.

2- O uso do exame do sedimento ao microscópio invertido mostrou boa sensibilidade para o diagnóstico do *Strongyloides*, apresentando concordância de 100% com o método de Baermann-Moraes, quando realizados os dois métodos simultaneamente nas mesmas amostras.

3- Quando utilizado em laboratório de rotina, o exame do sedimento obtido de toda a amostra fecal enviada, com uso do microscópio invertido, aumentou o diagnóstico do *Strongyloides* em pelo menos 110%, em comparação com o diagnóstico com o método de Hoffman, Pons & Janer realizado rotineiramente nas mesmas amostras, confirmando a boa sensibilidade do método.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAMNART, W.; PATTANAWONGSA, A.; INTAPAN, P. M.; MALEEWONG, W. Factors affecting recovery of *Strongyloides stercoralis* larvae: an approach to a newly modified formalin-ether concentration technique for diagnosis of strongyloidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 97-100, 2010.

ARAKAKI, T.; HASEGAWA, H.; ASATO, R.; IKESHIRO, T.; KINJO, F.; SAITO, A.; IWANAGA, M. A new method to detect *Strongyloides stercoralis* from human stool. **The Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 16, p. 11-17, 1988.

ATKINS, N. S.; CONWAY, D. J.; LINDO, J. F.; BAILEY, J. W.; BUNDY, D. A. L3 antigen specific antibody isotype responses in human strongyloidiasis: correlations with larval output. **Parasite Immunology**, v. 21, n. 10, p. 517-26, 1999.

BASUNI, M.; MUHI, J.; OTHMAN, N.; VERWEIJ, J. J.; AHMAD, M.; MISWAN, N.; RAHUMATULLAH, A.; AZIZ, F. A.; ZAINUDIN, N. S.; NOORDIN, R. A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 338-43, 2011.

BON, B.; HOUZE, S.; TALABANI, H.; MAGNE, D.; BELKADI, G.; DEVELOUX, M.; SENGHOR, Y.; CHANDENIER, J.; ANCELLE, T.; HENNEQUIN, C. Evaluation of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of strongyloidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1716-9, 2010.

BOSCOLO, M.; GOBBO, M.; MANTOVANI, W.; DEGANI, M.; ANSELMINI, M.; MONTEIRO, G. B.; MAROCCO, S.; ANGHEBEN, A.; MISTRETTA, M.; SANTACATTERINA, M.; TAIS, S.; BISOFFI, Z. Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for strongyloidiasis as a tool for diagnosis and follow-up. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 2, p. 129-33, 2007.

BRANNON, M. J., FAUST, E. C. Preparation and testing of a specific antigen for diagnosis of human strongyloidiasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, n. 2, p. 229-39, 1949.

BRINDLEY, P. J.; GAM, A. A.; PEARCE, E. J.; POINDEXTER, R. W.; NEVA, F. A. Antigens from the surface and excretions/secretions of the filariform larva of

Strongyloides stercoralis. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 28, n. 3, p.171-180, 1988.

CARROLL, S. M.; KARTHIGASU, K. T.; GROVE, D. I. Serodiagnosis of human strongyloidiasis by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 5, p. 706-9, 1981.

CONWAY, D. J.; BAILEY, J. W.; LINDO, J. F.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A.; BIANCO, A. E. Serum IgG reactivity with 41-, 31-, and 28-kDa larval proteins of *Strongyloides stercoralis* in individuals with strongyloidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 3, p. 784-787, 1993.

CONWAY, D. J.; LINDO, J. F.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A.; BIANCO, A. E. *Strongyloides stercoralis*: characterization of immunodiagnostic larval antigens. **Experimental Parasitology**, v. 79, n. 2, p. 99-105, 1994.

COSTA-CRUZ J. M.; BULLAMAH, C. B.; GONÇALVES-PIRES, MDO. R.; CAMPOS, D. M.; VIEIRA, M. A. Cryo-microtome sections of coproculture larvae of *Strongyloides stercoralis* and *Strongyloides ratti* as antigen sources for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, n. 6, p. 313-7, 1997.

COSTA-CRUZ, J. M.; MADALENA, J.; SILVA, D. A.; SOPELETE, M. C.; CAMPOS, D. M.; TAKETOMI, E. A. Heterologous antigen extract in ELISA for the detection of human IgE anti-*Strongyloides stercoralis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 5, p. 265-8, 2003.

DEKUMYOY, P.; SOMTANA, K.; JANTANAWIWAT, P.; NUAMTANONG, S.; SANGUANKIAT, S.; NUCHFAONG, S.; JANYAPOON, K.; CHINDANOND, D. Improved antigens for IgG ELISA diagnosis of strongyloidiasis. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health**, v. 33, n. 3, p. 53-9, 2002.

DE CARLI, G. A. **Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. 2 Ed. São Paulo: Atheneu, 2007, 906p.

DE PAULA, F. M.; DE CASTRO, E.; GONÇALVES-PIRES, M.; MARÇAL, M.; CAMPOS, D. M.; COSTA-CRUZ, J. M. Parasitological and immunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 1, p. 51-5, 2000.

DREYER, G., et al. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: implications for diagnosis and clinical trials. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 10, p. 2569-71, 1996.

EL-BADRY, A. A. ELISA-based coproantigen in human strongyloidiasis: a diagnostic method correlating with worm burden. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 39, n. 3, p. 757-68, 2009.

FELICIANO, N. D.; GONZAGA, H. T.; GONÇALVES-PIRES, MDO. R.; GONÇALVES, A. L.; RODRIGUES, R. M.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 67, n. 2, p. 153-61, 2010.

GAM, A. A.; NEVA, F. A.; KROTOSKI, W. A. Comparative sensitivity and specificity of ELISA and IHA for serodiagnosis of strongyloidiasis with larval antigens. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 37, n. 1, p. 157-61, 1987.

GENTA, R. M.; WEIL, G. J. Antibodies to *Strongyloides stercoralis* larval surface antigens in chronic strongyloidiasis. **Laboratory Investigation**, v. 47, n. 1, p. 87-90, 1982.

GENTA R. M.; SCHAD, G. A.; HELLMAN, M. E. *Strongyloides stercoralis*: parasitological, immunological and pathological observations in immunosuppressed dogs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 1, p. 34-41, 1986.

GREINER, K.; BETTENCOURT, J.; SEMOLIC, C. Strongyloidiasis: a review and update by case example. **Clinical Laboratory Science**, v. 21, n. 2, p. 82-8, 2008.

GROVE, D. I.; BLAIR, A. J. Diagnosis of human strongyloidiasis by immunofluorescence, using *Strongyloides ratti* and *Strongyloides stercoralis* larvae. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 2, p. 344-9, 1981.

GROVE, D. I. Human Strongyloidiasis. **Advances in Parasitology**, v.38, p.251-309, 1996.

HARADA, U.; MORI, O. A. A new method for culturing hookworm. **Yonago Acta Medica**, v. 1, p. 177-9, 1955.

HUAMAN, M. C.; SATO, Y.; AGUILAR, J. L.; TERASHIMA, A.; GUERRA, H.; GOTUZZO, E.; KANBARA, H. Gelatin particle indirect agglutination and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of strongyloidiasis using *Strongyloides venezuelensis* antigen. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 535-8, 2003.

KNOPP, S.; MGENI, A.; KHAMIS, I.; STEINMANN, P.; STOTHARD, J.; 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 Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 11, e331, 2008.

KOGA, K.; KASUYA, S.; KHAMBOONRUANG, C.; SUKHAVAT, K.; IEDA, M.; TAKATSUKA, N.; KITA, K.; OHTOMO, H. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, n. 4, p. 518–521, 1991.

KOBAYASHI, J.; SATO, Y.; TOMA, H.; TAKARA, M.; SHIROMA, Y. Application of enzyme immunoassay for postchemotherapy evaluation of human strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 18, n. 1, p. 19-23, 1994.

KOOSHA, S.; FESHARAKI, M.; ROKNI, M. B. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis of human strongyloidiasis. **Indian Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 6, p. 214-6, 2004.

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* spp. **Journal of Medical Microbiology**, 2010.

KROLEWIECKI, A. J.; RAMANATHAN, R.; FINK, V.; MCAULIFFE, I.; CAJAL, S. P.; WON, K.; JUAREZ, M.; DI PAOLO, A.; TAPIA, L.; ACOSTA, N.; LEE, R.; LAMMIE, P.; ABRAHAM, D.; NUTMAN, T. B. Improved diagnosis of *Strongyloides stercoralis* using recombinant antigen based serologies in a community-wide study in northern Argentina. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 10, p. 1624-30, 2010.

LINDO, J. F.; CONWAY, D. J.; ATKINS, N. S.; BIANCO, A. E.; ROBINSON, R. D.; BUNDY, D. A. Prospective evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot methods for the diagnosis of endemic *Strongyloides stercoralis* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 2, p. 175-9, 1994.

LIU, L. X.; WELLER, P. F. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 7, n. 3, p. 655-683, 1993.

LOUTFY, M. R.; WILSON, M.; KEYSTONE, J. S.; KAIN, K. C. Serology and eosinophil count in the diagnosis and management of strongyloidiasis in a non-endemic area. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 6, p. 749-52, 2002.

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; GONÇALVES-PIRES, M DO R.; DE OLIVEIRA, J. B.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulate antigen of two strains of *Strongyloides venezuelensis* in indirect immunofluorescence antibody test. **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 52-5, 2001.

MACHADO, E. R.; UETA, M. T.; DE FATIMA GONÇALVES-PIRES, MDO R.; ALVES DE OLIVEIRA, J. B.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 849-51, 2003.

MACHADO, E. R.; FACCIOLI, L. H.; COSTA-CRUZ, J. M.; LOURENÇO, E. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; GONÇALVES-PIRES, MDO. R.; UETA, M. T. *Strongyloides venezuelensis*: the antigenic identity of eight strains for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 1, p. 7-14, 2008.

MANGALI, A.; CHAICUMPA, W.; NONTASUT, P.; CHANTAVANIJ, P.; TAPCHAISRI, P.; VIRAVAN, C. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human strongyloidiasis. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health**, v. 22, n. 1, p. 88-92, 1991.

MARQUES, C. C.; DA PENHA ZAGO-GOMES, M.; GONÇALVES, C. S.; PEREIRA, F. E. Alcoholism and *Strongyloides stercoralis*: daily ethanol ingestion has a positive correlation with the frequency of *Strongyloides* larvae in the stools. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, e717, 2010.

MONTEIRO C. A.; ZUÑIGA, H. P. P.; BENÍCIO, M. H. D. A.; SZARFA, S. C. Estudo das condições de saúde das crianças do município de São Paulo (Brasil), 1984/1985. I – Aspectos epidemiológicos, características socioeconômicas e ambiente físico. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, n. 6, p. 435-45, 1986.

MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço de Saúde Pública (RJ)**, v. 1, n. 3, p. 507-624, 1948.

MOTA-FERREIRA, D. M.; GONÇALVES-PIRES, MDO. R.; JÚNIOR, A. F.; SOPELETE, M. C.; ABDALLAH, V. O.; COSTA-CRUZ, J. M. Specific IgA and IgG antibodies in paired serum and breast milk samples in human strongyloidiasis. **Acta Tropica**, v. 109, n. 2, p. 103-7, 2009.

NEVA, F. A.; GAM, A. A.; BURKE, J. Comparison of larval antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for strongyloidiasis in humans. **Journal of Infectious Diseases**, v. 144, n. 5, p. 427-32, 1981.

NEVA, F. A. Biology and immunology of human strongyloidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 153, n. 3, p. 397-406, 1986.

NEVA, F. A.; GAM, A. A.; MAXWELL, C.; PELLETIER, L. L. Skin test antigens for immediate hypersensitivity prepared from infective larvae of *Strongyloides stercoralis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 567-72, 2001.

NEVES, D. P. Parasitologia Dinâmica. 3 ed., São Paulo: Atheneu, 2009.

OMS. The public health significance of ascariasis. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, p. 465-466, 2004.

PESSÔA, S. B. Superfamília Rhabdiasoidea - *Strongyloides stercoralis* e estrogiloidose. In: PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**. 10 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 569-80, 1978.

PORTO, A. F.; OLIVEIRA FILHO, J.; NEVA, F. A.; ORGE, G.; ALCÂNTARA, L.; GAM, A.; CARVALHO, E. M. Influence of human T-cell lymphocytotropic virus type 1 infection on serologic and skin tests for strongyloidiasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 610-3, 2001.

RAMACHANDRAN, S.; THOMPSON, R. W.; GAM, A. A.; NEVA, F. A. Recombinant cDNA clones for immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 1, p. 196-203, 1998.

RAVI, V.; RAMACHANDRAN, S.; THOMPSON, R. W.; ANDERSEN, J. F.; NEVA, F. A. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 125, n. 1-2, p. 73-81, 2002.

RIBEIRO, V. S., FELICIANO, N. D., GONZAGA, H. T., COSTA, I. N., GONÇALVES-PIRES, M. R., UETA, M. T., COSTA-CRUZ, J. M. Detergent fraction of heterologous antigen to detect IgA and IgG in strongyloidiasis using saliva and serum paired samples. **Immunology letters**, v. 134, n. 1, p. 69-74, 2010.

RODRIGUES, R. M; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; TAKETOMI, E. A.; COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides ratti* antigenic components

recognized by IgE antibodies in immunoblotting as an additional tool for improving the immunodiagnosis in human strongyloidiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 89-93, 2004.

RODRIGUES, R. M.; DE OLIVEIRA, M. C.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A.; CAMPOS, D. M.; TAKETOMI, E. A.; COSTA-CRUZ, J. M. IgG1, IgG4, and IgE antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen. **Parasitology Research**, v. 101, n. 5, p. 1209-14, 2007.

ROSSI, C. L.; TAKAHASHI, E. E.; TEIXEIRA, A. L.; DE BARROS-MAZON, S.; TREVISAN, R. C. The evaluation of antigenic preparations of *Strongyloides stercoralis* for the immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 26, n. 2, p. 83-7, 1993.

SALAZAR, S. A.; GUTIERREZ, C.; BERK, S. L. Value of the agar plate method for the diagnosis of intestinal strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 23, n. 4, p. 141-5, 1995.

SATO, Y.; TAKARA, M.; OTSURU, M. Detection of antibodies in strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 1, p. 51-5, 1985.

SATO, Y.; OTSURU, M.; TAKARA, M.; SHIROMA, Y. Intradermal reactions in strongyloidiasis. **International Journal for Parasitology**, v. 16, n. 1, p. 87-91, 1986.

SATO, Y.; TOMA, H.; TAKARA, M.; SHIROMA, Y. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for mass examination of strongyloidiasis in Okinawa, Japan. **International journal for parasitology**, v. 20, n. 8, p. 1025-9, 1990.

SATO, Y.; TOMA, H.; KIYUNA, S.; SHIROMA, Y. Gelatin particle indirect agglutination test for mass examination for strongyloidiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 4, p. 515-8, 1991.

SATO, Y.; KOBAYASHI, J.; SHIROMA, Y. Serodiagnosis of strongyloidiasis. The application and significance. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 1, p. 35-41, 1995a.

SATO, Y.; KOBAYASHI, J.; TOMA, H.; SHIROMA, Y. Efficacy of stool examination for detection of *Strongyloides* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 3, p. 248-50, 1995b.

SIDDIQUI, A. A.; BERK, S.L. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 7, p. 1040-7, 2001.

SILVA, L. P.; BARCELOS, I. S.; PASSOS-LIMA, A. B.; ESPINDOLA, F. S.; CAMPOS, D. M.; COSTA-CRUZ, J. M. Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 687-91, 2003.

SITHITHAWORN, P.; SRISAWANGWONG, T.; TESANA, S.; DAENSEEKAEW, W.; SITHITHAWORN, J.; FUJIMAKI, Y.; ANDO, K. Epidemiology of *Strongyloides stercoralis* in north-east Thailand: application of the agar plate culture technique compared with the enzyme-linked immunosorbent assay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 4, p. 398-402, 2003.

SITHITHAWORN, J.; SITHITHAWORN P; JANRUNGSOPA, T; SUVATANADECHA, K.; ANDO, K.; HASWELL-ELKINS, M. R. Comparative assessment of the gelatin particle agglutination test and an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of strongyloidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3278-82, 2005.

SOUSA-FIGUEIREDO, J. C.; DAY, M.; BETSON, M.; ROWELL, C.; WAMBOKO, A.; ARINAITWE, M.; KAZIBWE, F.; KABATEREINE, N. B.; STOTHARD, J. R. Field survey for strongyloidiasis in eastern Uganda with observations on efficacy of preventive chemotherapy and co-occurrence of soil-transmitted helminthiasis/intestinal schistosomiasis. **Journal of Helminthology**, v. 20, p. 1-9, 2010.

STEINMANN, P.; ZHOU, X. N.; DU, Z. W.; JIANG, J. Y.; WANG, L. B.; WANG, X. Z.; LI, L. H.; MARTI, H.; UTZINGER, J. Occurrence of *Strongyloides stercoralis* in

Yunnan province, China, and comparison of diagnostic methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, n. 1, e75, 2007.

SUKHAVAT, K.; MORAKOTE, N.; CHAIWONG, P.; PIANGJAI, S. Comparative efficacy of four methods for the detection of *Strongyloides stercoralis* in human stool specimens. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 95-6, 1994.

UPARANUKRAW, P.; PHONGSRI, S.; MORAKOTE, N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 6, p. 967-73, 1999.

VARATHARAJALU, R.; PARANDAMAN, V.; NDAO, M.; ANDERSEN, J. F.; NEVA, F. A. *Strongyloides stercoralis* excretory/secretory protein strongylastacin specifically recognized by IgE antibodies in infected human sera. **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 2, p. 115-22, 2011.

VERWEIJ, J. J.; CANALES, M.; POLMAN, K.; ZIEM, J.; BRIENEN, E. A.; POLDERMAN, A. M.; VAN LIESHOUT, L. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 4, p. 342-6, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Prevention and control of intestinal parasitic infections report of a WHO Expert Committee. Geneva, 1987.

Anexo I

Peso das amostras e idade e gênero dos pacientes incluídos no estudo provenientes do Laboratório de rotina do Hospital Cassiano Antonio de Moraes (HUCAM). Os casos marcados em cinza são positivos para *Strongyloides stercoralis*.

EXAME	PESO DAS AMOSTRAS (g)	GÊNERO	IDADE (anos)	EXAME	PESO DAS AMOSTRAS (g)	GÊNERO	IDADE (anos)
1	13	M	50	112	25	F	61
2	14	M	40	113	27	F	45
3	17	M	45	114	28	F	76
4	12	M	49	115	15	M	45
5	16	M	42	116	10	M	17
6	14	F	28	117	10	F	20
7	12	F	36	118	20	F	53
8	13	M	49	119	25	M	6
9	11	M	49	120	18	F	11
10	12	M	14	121	23	F	22
11	15	M	6	122	20	M	58
12	12	F	72	123	20	M	24
13	14	M	49	124	21	F	1
14	21	M	7	125	15	F	18
15	15	F	25	126	25	F	1
16	13	F	44	127	15	F	72
17	11	M	46	128	10	F	36
18	18	F	34	129	30	M	72
19	15	F	30	130	17	M	1
20	13	F	31	131	15	F	35
21	12	F	87	132	10	F	8
22	15	F	73	133	25	F	35
23	20	F	17	134	16	M	4
24	34	F	9	135	20	M	45
25	19	M	6	136	10	M	74
26	16	F	24	137	12	M	nd
27	25	F	67	138	26	M	70
28	20	F	44	139	24	F	2
29	20	F	54	140	10	F	48
30	10	F	54	141	27	F	30
31	30	M	9	142	30	F	52
32	23	F	18	143	17	F	45
33	15	F	17	144	22	M	7
34	25	F	3	145	44	M	75
35	15	F	11	146	26	F	58
36	30	F	55	147	26	M	6
37	10	F	55	148	13	M	9
38	14	F	14	149	13	F	42
39	25	M	83	150	49	M	7
40	23	M	33	151	28	M	18
41	22	F	15	152	10	M	23
42	20	M	21	153	11	F	64
43	15	M	56	154	16	F	50
44	20	F	47	155	17	M	51

45	18	M	45	156	25	F	60
46	18	M	1	157	10	F	70
47	28	M	9	158	16	M	48
48	15	M	65	159	30	M	52
49	10	F	70	160	22	F	63
50	30	M	39	161	18	M	28
51	30	M	45	162	15	F	35
52	20	M	57	163	16	M	45
53	15	F	54	164	33	M	54
54	25	M	23	165	50	F	41
55	18	F	46	166	40	M	55
56	14	M	51	167	38	F	48
57	10	M	45	168	30	M	47
58	10	M	13	169	32	F	48
59	18	M	24	170	23	M	60
60	15	F	58	171	20	F	66
61	19	F	24	172	24	F	65
62	10	F	80	173	27	M	23
63	20	F	18	174	15	M	57
64	13	M	5	175	10	F	38
65	21	M	52	176	11	M	55
66	12	F	3	177	19	F	28
67	13	M	2	178	27	M	48
68	21	M	59	179	20	M	68
69	20	F	47	180	40	M	58
70	15	M	5	181	10	F	76
71	13	M	4	182	35	F	19
72	30	M	22	183	40	F	56
73	19	M	50	184	13	M	48
74	15	F	18	185	40	F	43
75	10	M	nd	186	45	F	79
76	25	M	44	187	20	M	15
77	15	F	29	188	35	M	61
78	20	F	59	189	40	F	11
79	23	M	54	190	13	F	13
80	20	M	58	191	15	M	41
81	12	F	27	192	10	F	66
82	18	F	73	193	13	M	26
83	18	F	45	194	16	F	70
84	23	M	46	195	13	F	8
85	18	M	35	196	10	F	68
86	33	M	14	197	19	F	54
87	20	F	48	198	17	F	26
88	13	F	38	199	10	M	10
89	16	M	40	200	11	M	6
90	15	M	13	201	19	F	55
91	18	M	16	202	10	F	43
92	24	M	51	203	39	F	36
93	10	F	17	204	25	M	21
94	25	F	37	205	22	F	57
95	24	M	46	206	16	M	42
96	30	F	40	207	10	F	2
97	34	M	38	208	10	M	73
98	18	M	37	209	18	M	51

99	20	F	75	210	14	M	49
100	13	M	55	211	13	F	28
101	10	M	45	212	25	M	46
102	20	M	65	213	19	M	44
103	39	M	41	214	30	M	40
104	42	F	55	215	19	F	40
105	32	M	36	216	10	M	43
106	59	F	66	217	30	F	72
107	10	F	35	218	25	M	50
108	35	M	61	219	20	F	55
109	28	M	41	220	30	F	4
110	25	M	9	221	25	M	45
111	28	M	41				

Anexo II

Gênero e idade dos pacientes incluídos no estudo provenientes do Hospital Cassiano Antonio de Moraes (HUCAM) para análise com os métodos de Baermann-Moraes e o exame de todo o sedimento com o auxílio do microscópio invertido. Os casos marcados em cinza são positivos para *Strongyloides stercoralis*.

EXAME	GÊNERO	IDADE (anos)	EXAME	GÊNERO	IDADE (anos)
1	M	50	57	F	38
2	M	41	58	M	54
3	F	76	59	F	54
4	M	50	60	F	72
5	M	51	61	M	53
6	M	54	62	M	34
7	M	70	63	F	55
8	M	60	64	M	23
9	M	65	65	M	44
10	M	34	66	M	11
11	M	47	67	F	44
12	F	48	68	M	52
13	M	55	69	F	52
14	M	61	70	F	52
15	M	73	71	F	31
16	M	65	72	F	58
17	F	12	73	F	13
18	M	47	74	M	58
19	M	64	75	M	47
20	M	57	76	F	56
21	F	39	77	F	58
22	M	8	78	M	2
23	F	67	79	M	2
24	F	53	80	F	79
25	M	1	81	M	nd
26	M	45	82	M	2
27	F	52	83	F	20
28	F	49	84	F	68
29	M	36	85	F	nd
30	M	60	86	F	14
31	F	19	87	M	21
32	M	49	88	M	55
33	M	9	89	F	44
34	M	73	90	M	46
35	F	63	91	M	33
36	M	60	92	F	50
37	F	64	93	F	50
38	M	24	94	F	50
39	F	39	95	M	46
40	M	59	96	M	44
41	M	51	97	F	71
42	M	38	98	M	44
43	F	60	99	F	74
44	M	69	100	F	53

45	F	35	101	F	31
46	F	81	102	F	47
47	M	5	103	M	60
48	M	39	104	M	33
49	F	63	105	F	35
50	F	57	106	M	38
51	F	72	107	M	38
52	F	40	108	M	52
53	F	43	109	F	37
54	M	41	110	M	64
55	F	1	111	M	58
56	F	3	112	M	38

Anexo III

Gênero e idade dos pacientes incluídos no estudo provenientes do Laboratório de rotina do Hospital Fundação Concórdia, de Santa Maria de Jetibá. Os casos marcados em cinza são positivos para *Strongyloides stercoralis*.

EXAME	GÊNERO	IDADE (anos)	EXAME	GÊNERO	IDADE (anos)
1	M	21	52	M	42
2	F	63	53	F	38
3	M	4	54	F	10
4	F	21	55	M	9
5	F	51	56	M	12
6	F	33	57	F	14
7	M	48	58	M	24
8	F	51	59	F	29
9	M	17	60	M	45
10	F	48	61	F	28
11	F	2	62	F	65
12	M	30	63	M	31
13	F	30	64	M	32
14	F	54	65	F	37
15	F	46	66	M	19
16	F	31	67	F	41
17	F	20	68	F	64
18	M	30	69	M	74
19	M	38	70	F	71
20	M	26	71	F	10
21	M	17	72	F	41
22	F	29	73	M	nd
23	M	2	74	F	2
24	M	23	75	F	1
25	F	70	76	F	49
26	M	31	77	M	40
27	M	3	78	F	43
28	F	24	79	M	63
29	M	64	80	F	37
30	F	25	81	M	11
31	F	58	82	F	45
32	F	20	83	M	49
33	F	1	84	M	16
34	F	1	85	M	70
35	M	1	86	F	31
36	M	18	87	M	70
37	F	37	88	M	6
38	M	4	89	M	10
39	F	32	90	F	38
40	F	19	91	M	38
41	F	23	92	M	8
42	F	34	93	M	13
43	M	6	94	M	2
44	F	16	95	M	64
45	M	60	96	F	8
46	F	42	97	F	17

47	M	2	98	F	27
48	F	45	99	F	15
49	M	22	100	M	69
50	M	8	101	M	48
51	M	2	102	F	8