

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

SISBI/UFU



1000213202

MON  
516.995.132.2  
M5392  
TES/MEM

***Suzan Cristina de Lacerda Mendonça***

**Estudo da associação entre diabetes mellitus e a  
infecção pelo *Strongyloides stercoralis***

Tese de doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas,  
como parte das exigências para obtenção  
do título de Doutor em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas.

Uberlândia- MG  
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

*Suzan Cristina de Lacerda Mendonça*

**Estudo da associação entre diabetes mellitus e a  
infecção pelo *Strongyloides stercoralis*.**

Tese de doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas,  
como parte das exigências para obtenção  
do título de Doutor em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas.

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Julia Maria Costa-Cruz**  
**Orientadora**

**Uberlândia- MG**  
**2003**

*Dedicatória*

*A Deus, pelas inúmeras bênçãos e oportunidades que me proporcionou. Permita que eu tenha sapiência para não desperdiçá-las.*

*Aos meus filhos Arthur e Otávio, por terem me ensinado que o amor não tem limites e que é possível ser melhor quando aprendemos o que as crianças têm para nos ensinar. Amo vocês.*

*Ao meu esposo Orlando que sempre esteve ao meu lado me apoiando, estimulando e confiando nas minhas escolhas. O caminho ao seu lado é mais seguro. Obrigada.*

*À minha mãe, Neyde, que é a grande responsável pelo que eu sou, que me ensinou através do exemplo as maiores virtudes do homem como amor, honestidade, humildade, ética e perseverança.*

*Agradecimentos*

*À professora Dra. Julia Maria Costa-Cruz, minha orientadora, que foi antes de tudo uma grande amiga. Sem o seu estímulo talvez não tivesse sido possível esta conquista.*

*Aos meus queridos pacientes que colaboraram com esta pesquisa e acreditaram no meu trabalho. Obrigada.*

*À minha querida amiga Flávia D. Lima Menegaz, você me ensinou a perseverar quando eu acreditava que não tinha mais forças para isto. Tenho aprendido muito com você.*

*Aos colegas Rosângela M Rodrigues, Maria do Rosário F. Gonçalves, Cláudio V Silva, Gleyce A. Machado, Álvaro F. Junior, pelo auxílio nas várias etapas da realização deste trabalho.*

*À técnica de laboratório Maria das Graças Marçal pela amizade e grande ajuda na realização deste trabalho.*

*Ao secretário do curso de pós-graduação João Martins Neto, pela disposição, educação e carinho com que sempre me atendeu.*

*“...Não me obrigues a ler os livros que eu ainda não adivinhei  
nem queiras que eu saiba o que ainda não sou capaz de interrogar  
Protege-me das incursões obrigatórias que sufocam o prazer da descoberta  
e com o silêncio (intimamente sábio) das tuas palavras e dos teus gestos  
ajuda-me serenamente a ler e a escrever a minha própria vida.”*

*Ademar Ferreira dos Santos*

# SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Diabetes mellitus e estrogiloidíase .....	7
2. OBJETIVOS .....	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. Aspectos éticos .....	11
3.2. Pacientes .....	11
3.3. Parasitológico de fezes .....	12
3.4. Obtenção de <i>Strongyloides stercoralis</i> .....	12
3.5. Produção de antígenos de <i>S. stercoralis</i>	
3.5.1. Antígeno para o teste de Imunofluorescência indireta .....	13
3.5.2. Antígeno salino para ELISA e <i>Western blotting</i> .....	13
3.6. Amostras de soros .....	14
3.7. Testes imunológicos	
3.7.1. Teste de imunofluorescência indireta .....	14
3.7.2. Teste ELISA .....	15
3.7.3. Teste de <i>Western blotting</i>	
3.7.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	16
3.7.3.2. Coloração do gel .....	17
3.7.3.3. Realização do <i>Western Blotting</i> .....	18
3.8. Tratamento.....	19
3.9. Análise estatística .....	19
3.10. Normas de biossegurança .....	20
4. RESULTADOS .....	21
5. DISCUSSÃO .....	29
6. CONCLUSÕES .....	34
7. RESUMO .....	35
8. ABSTRACT .....	36
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37

## *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

A estrogiloidíase é uma helmintose de distribuição mundial, embora sua prevalência seja maior em regiões tropicais e subtropicais, o que coloca o Brasil entre os países considerados hiperendêmicos para esta parasitose (PIRES; DREYER, 1993).

A maioria dos casos de infecção pelo *Strongyloides stercoralis* transcorre assintomática ou oligosintomática e mesmo quando presentes, os sintomas são inespecíficos e comuns a outras formas de parasitismo. Uma particularidade da estrogiloidíase é a capacidade de provocar infecção disseminada, muitas vezes com evolução fatal (GROVE, 1996).

Foram descritas, até hoje, 52 espécies de *Strongyloides* e a maioria delas de pouca importância na área médica. Destacam-se duas espécies que podem parasitar o homem: *S. stercoralis*, *S. fuelleborni* e uma sub-espécie, o *S. fuelleborni kellyi* (PIRES; DREYER, 1993; FERREIRA; COSTA-CRUZ, 2003).

A infecção pelo *S. stercoralis* acontece pela penetração, através da pele íntegra ou das mucosas (quando são deglutidas), de larvas filarióides (L3) presentes no solo ou alimentos contaminados. A penetração das larvas é facilitada pela liberação de uma metaloprotease. Esta enzima é imunogênica e muito importante no processo de migração da larva, uma vez que a invasão através da pele pode ser impedida com uso de inibidores da metaloprotease. Após penetração pela pele ou mucosas, o caminho seguido pelas larvas é objeto de estudo e de controvérsias. Classicamente descreve-se um trajeto, via corrente sanguínea, até os alvéolos pulmonares e deste local ascendem pela

via respiratória, atingem a traquéia e são deglutidas, abrigando-se no intestino delgado onde irão completar seu desenvolvimento. Contudo, através de cintilografia com  $^{75}\text{Se}$ , foi demonstrado que as larvas podem alcançar o duodeno através de outras vias de penetração, como vísceras e tecidos (AIKENS; SCHAD, 1989; MANSFIELD *et al.*, 1995; MANSFIELD *et al.*, 1996).

As larvas se transformam em vermes adultos, alojando-se nas criptas de Lieberkühn, ou formam túneis na submucosa intestinal. Os ovos liberados pelas fêmeas adultas rapidamente atingem a maturidade e as larvas rabditóides (L1) migram para a luz intestinal sendo, nesta forma, eliminadas nas fezes. As larvas rabditóides presentes no duodeno podem se transformar em larvas filarióides, que penetram pela mucosa do colon ou região perianal, possibilitando a auto-infecção (PIRES; DREYER, 1993; FERREIRA; COSTA-CRUZ, 2003).

A estrogiloidíase é endêmica em regiões tropicais, particularmente sudeste da Ásia, América do Sul e África. Áreas de alta prevalência foram descritas ainda no leste da Europa, Cáucaso, norte da Inglaterra, EUA (Carolinas, Lousiana, Tennessee e Kentucky) e Austrália (GENTA, 1989; LIU ; WELLER, 1993).

No Brasil, os estados de Minas Gerais, Amapá, Goiás e Rondônia apresentam as maiores prevalências (FERREIRA, 1991; ANDRADE NETO; ASSEF, 1996). Em Uberlândia (MG), um levantamento em creches demonstrou prevalência da estrogiloidíase em 13% das crianças (MACHADO; COSTA-CRUZ, 1998). Resultado semelhante foi obtido em estudo feito, também em creches, na cidade de Goiânia (SANTOS *et al.*, 1990). Dados hospitalares apontam para a ocorrência de estrogiloidíase em 3,3% das crianças (PAULA *et al.*, 2000) e em 3,8% dos pacientes com AIDS no Hospital Universitário de

Uberlândia (COSTA-CRUZ; FERREIRA; ROSSIN, 1996).

Nos Estados Unidos, Milder *et al.* (1981) descreveram a estrogiloidíase como sendo a parasitose intestinal mais comum, acometendo principalmente homens com mais de 50 anos de idade. Outro estudo procurou avaliar os fatores de risco para estrogiloidíase e encontrou um risco relativo (RR) maior em brancos (RR=5.6), homens (RR=3.9), pacientes que fazem uso de corticóide (RR=3.3), portadores de malignidade hematológica (RR=5.2) ou submetidos à gastrectomia prévia (RR=11.5) (DAVIDSON; FLETCHER; CHAPMAN, 1984).

A prevalência de estrogiloidíase tende a ser subestimada, pois é comum a utilização, como método diagnóstico, de apenas uma amostra de fezes. Uma maior sensibilidade do exame parasitológico de fezes pode ser alcançada pela análise de várias amostras colhidas durante alguns dias (DREYER *et al.*, 1996; UPARANUKRAW; PHONGSRI; MORAKOTE, 1999).

A resposta imune do hospedeiro ao *S. stercoralis* é um fator importante no controle da disseminação da doença, embora os mecanismos de defesa não estejam ainda muito claros. No mecanismo de resposta T- independente, fatores de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1), secretados pelos macrófagos, levam à proliferação das células caliciformes no epitélio que aumentam a secreção mucosa para facilitar a expulsão dos parasitas (COSTA-CRUZ, 2000).

Anticorpos da classe IgG, especialmente IgG4, são produzidos pelo hospedeiro, atuando como fator inibitório da reação alérgica mediada por IgE. Na resposta imune mediada pelas células T, predominantemente as células Th2, a secreção de interleucinas (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) estimula as células B

a produzirem anticorpos IgE e IgG4. Os parasitos são danificados pelos anticorpos e pelos produtos de degranulação dos mastócitos, sensibilizados por IgE (PIRES; DREYER, 1993; COSTA-CRUZ, 2000).

São descritas duas formas clínicas da doença: estrogiloidíase crônica não complicada e a forma grave complicada. A maioria dos pacientes está no primeiro grupo, sendo 50% destes assintomáticos. As manifestações gastrointestinais mais freqüentes incluem dor abdominal, náusea, vômito, diarreia, emagrecimento e obstipação. Sinais cutâneos como "*larva currens*" é patognomônico, mas a urticária inespecífica é a manifestação mais comum. (FERREIRA, 1991; LIU; WELLER, 1993; PIREZ; DREYER, 1993; GROVE, 1996).

Na forma complicada são descritos, no trato gastrointestinal, esteatorrêia e má absorção, isquemia mesentérica, obstrução intestinal e sangramento gastro intestinal, muitas vezes simulando tumores intestinais (SOERENSEN *et al.*, 1964; HACKFORD, 1994; GROVE, 1996). As complicações pulmonares variam de tosse seca e dispnéia leve até insuficiência respiratória grave. O exame radiológico dos pulmões pode se apresentar como consolidação lobar e outras vezes como infiltrado intersticial (GONÇALVES; FERREIRA, 1984). O sistema nervoso central pode ser acometido, resultando em meningite ou abscesso cerebral. Foi descrito síndrome nefrótica com remissão após erradicação do *S. stercoralis* (WONG *et al.*, 1998). Na forma disseminada, qualquer órgão pode ser acometido, sendo comum a associação com septicemia por enterobactérias (FERREIRA, 1991).

O diagnostico clínico apresenta baixa sensibilidade, uma vez que a maioria dos casos é assintomática. Como algumas vezes a carga parasitária é

muito baixa, a eliminação de larvas pelas fezes é irregular e pequena. A realização de técnicas de rotina para exame coproparasitológico como Lutz ou Hoffmann, Pons e Janer (1934), Ritchie (1948) e Faust (1939), não são adequadas para detecção do *S. stercoralis*. Os métodos parasitológicos de Baermann (1917) modificado por Moraes (1948) e de Rugai, Mattos e Brisola (1954) são os indicados, pois se baseiam no hidro e termotropismo das larvas. Ainda assim, são necessárias várias amostras de fezes colhidas em dias alternados (LIU; WELLER, 1993; UPARANUKRAW; PHONGSRI; MORAKOTE, 1999; Van der FELTZ *et al.*, 1999; COSTA-CRUZ, 2000).

A cultura das fezes pode ser utilizada com objetivo de aumentar o número de larvas e tornar possível sua identificação, embora seja tecnicamente difícil pelo risco de infecção durante a manipulação das larvas infectantes e pela demora na obtenção dos resultados. Na doença disseminada, a identificação do parasito pode ser feita em secreções (escarro, urina, lavado brônquico, líquido pleural) ou através de biópsia de tecidos (NEWTON *et al.*, 1992).

O hemograma pode mostrar eosinofilia tanto na forma crônica não complicada como na disseminada. No entanto, muitos casos descritos da forma disseminada apresentam contagem normal de eosinófilos (CARVALHO *et al.*, 1983; GONÇALVES; FERREIRA, 1984; HACKFORD, 1994, van der FELTZ *et al.*, 1999).

Os testes sorológicos são muito úteis no auxílio diagnóstico, principalmente pela alta sensibilidade. O teste mais usado e que tem se mostrado com sensibilidade e especificidade elevadas é o Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), usando como antígeno extrato salino e alcalino

de larvas filarióides, homólogas ou heterólogas (de MESSIAS *et al.*, 1987; GENTA, 1988; LINDO *et al.*, 1994; van der FELTZ *et al.*, 1999; MERCADO *et al.*, 2002; FERREIRA; COSTA -CRUZ, 2003; SUDARSHI *et al.*, 2003). A imunofluorescência indireta utilizando como antígeno larvas L3 para detecção de IgG, IgM e IgA circulantes e o teste de *Western blotting* para detecção de IgG específica (frações protéicas de 97, 66, 41, 31 e 28 kDa) são mais específicos no diagnóstico e possivelmente no controle de cura (de MESSIAS *et al.*, 1987; LIU; WELLER, 1993; PIRES; DREYER, 1993; GROVE, 1996; LINDO *et al.*, 1996; COSTA-CRUZ, 2000).

Outros testes imunológicos foram propostos, embora pouco utilizados atualmente, como o teste cutâneo com extrato de larvas (PELLEGRINO; CHAIA; POMPEU MEMORIA, 1961), aglutinação indireta com partículas de gelatina (SATO *et al.*, 1991), imunofluorescência direta em biópsias (FOGAÇA *et al.*, 1990) e radioimunoensaio (LEÃO; BARROS; MENDES, 1980), entre outros.

O tratamento da estrogiloidíase, tanto na forma assintomática como na disseminada, é realizado tradicionalmente com o Tiabendazol, obtendo-se um melhor índice de cura com repetidos períodos de tratamento (GROVE, 1996; FERREIRA; COSTA-CRUZ, 2003). A posologia na forma crônica não complicada é de 25 ou 50 mg/Kg/dia por dois a três dias e na forma complicada a dose de 50 mg/Kg/dia é repetida por sete dias a dez dias, não ultrapassando a dose diária de 3 g/dia (FERREIRA, COSTA-CRUZ, 2003).

A resposta terapêutica ao Albendazol (16/mg/Kg/dia por 5 dias) é muito controversa, com relatos de cura variando de 50% a 85% dos casos tratados (GRYSCHER *et al.*, 1992). A ivermectina (200 µg/kg em dose única) mostrou,

em alguns estudos, índices de cura de 85%, apresentando efeitos colaterais moderados, como diarreia, anorexia e prurido (LIU; WELLER, 1993; LINDO *et al.*, 1996; FERREIRA *et al.*, 1999; HUGGINS *et al.*, 2001).

### **1.1. Diabetes mellitus e estrogiloidíase**

O diabetes mellitus é uma síndrome caracterizada por hiperglicemia crônica, decorrente de uma resposta ineficiente das células beta do pâncreas na secreção de insulina e/ou devido a defeito na ação da insulina. Os critérios para diagnóstico e classificação do diabetes foram revistos pela American Diabetes Association (ADA) e através da nova classificação são caracterizadas duas formas da doença: tipo 1 (doença autoimune que leva à destruição das células beta pancreáticas) e tipo 2 (abrange desde formas com resistência insulínica até deficiência na secreção da insulina). Além das duas formas descritas existe o diabetes secundário a outras doenças e o gestacional. Através dos novos critérios propostos pela ADA, glicemias de jejum com valores iguais ou maiores a 126 mg/dL são considerados diagnósticos de diabetes mellitus, ou glicemia maior ou igual a 200 mg/dl, duas horas após sobrecarga oral de glicose (The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus, 1997).

Os indivíduos portadores de diabetes mellitus são mais susceptíveis às graves infecções bacterianas e as razões apontadas para isto são a doença arterial, neuropatia diabética e alterações das respostas do sistema imunológico induzidas pelo diabetes (BESSMAN; SAPICO, 1992; MOUTSCHEN; SCHEEN; LEFEBVRE, 1992; BALASOIU *et al.*, 1997; DELAMAIRE *et al.*, 1997). Pacientes diabéticos tendem a desenvolver, além de

alterações do sistema imunológico, complicações em vários órgãos e sistemas dependendo do tempo de evolução da doença e do nível de controle metabólico. Uma destas complicações, a gastroparesia, decorre de uma neuropatia do sistema nervoso autônomo e manifesta-se com diminuição do peristaltismo gastrointestinal e hipocloridria gástrica, que pode contribuir para a auto-infecção interna, hiperinfecção ou disseminação da estrongiloidíase nestes pacientes.

Há, na literatura médica, apenas relatos de casos de formas disseminadas da infecção pelo *S. stercoralis* em indivíduos portadores de diabetes mellitus (VENTURI; VILLOTTI, 1984; DEBUSSCHE *et al.*, 1988; COOVADIA; RAJPUT; BHANA, 1993; HIGASHIYAMA *et al.*, 1997; HO *et al.*, 1997; AI SAMMAN; HAQUE; LONG, 1999; EMAD, 1999; LINDER *et al.*, 2000), entretanto não existem estudos controlados avaliando se há uma maior predisposição destes pacientes a estrongiloidíase.

O estudo da estrongiloidíase em portadores de diabetes mellitus se justifica pela alta prevalência das duas morbidades no nosso meio. Em Uberlândia (MG), Machado e Costa-Cruz (1998) relataram prevalência de 13% de estrongiloidíase em 300 crianças com idade entre 4 meses e 7 anos. Outro estudo, na mesma região, utilizando métodos imunológicos, revelou resultados positivos em 12% de 83 crianças imunossuprimidas (PAULA *et al.*, 2000). A síndrome de hiperinfecção pelo *S. stercoralis* foi descrita em sete pacientes portadores de co-infecção pelo vírus HIV no período de janeiro de 1990 a junho de 1996 em Uberlândia, e a prevalência descrita de estrongiloidíase nesta série de pacientes foi de 3,85% (FERREIRA *et al.*, 1999).

O diabetes mellitus atinge 7,6% da população urbana adulta entre 30-69

anos no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1988). No Rio Grande do Sul, foi identificada prevalência de 4,1% de diabetes em pacientes internados (LISBOA *et al.*, 2000). Em Uberlândia, estudo realizado em pessoas com mais de 50 anos de idade, detectou presença de diabetes em 7,5% da amostra estudada (MENDONÇA; JORGE, 1997)

Considerando ainda que o paciente diabético apresenta algumas características peculiares que poderiam favorecer a disseminação da *estrongiloidíase*, a identificação e o tratamento dos portadores crônicos assintomáticos poderia evitar estes casos graves.

*Objetivos*

## 2. OBJETIVOS

Estudar a frequência de infecção pelo *Strongyloides stercoralis* em pacientes portadores de diabetes mellitus 2, comparando-a com grupo controle de pacientes portadores de outras doenças endócrinas (obesidade, dislipidemia, doenças tiroideanas, etc.) atendidos no ambulatório de endocrinologia geral do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Correlacionar a presença de infecção pelo *S. stercoralis* com aspectos clínicos e laboratoriais, como nível de controle do diabetes, presença de sinais ou sintomas sugestivos da doença e a presença de eosinofilia no hemograma. Após identificação dos casos, promover o tratamento de todos portadores crônicos, sintomáticos ou não.

## *Materiais e Métodos*

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Aspectos éticos**

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento em participar do estudo.

#### **3.2. Pacientes**

Foram avaliados 120 pacientes atendidos em um dos ambulatórios de Endocrinologia da Universidade Federal de Uberlândia, no período de julho de 2001 a março de 2003. Os pacientes diabéticos foram incluídos consecutivamente, sendo os controles pareados quanto ao sexo e idade. O grupo controle foi composto por pacientes atendidos no mesmo ambulatório e portadores de outras doenças endócrinas (excetuando-se casos de síndrome de Cushing ou pacientes em uso de corticóide por qualquer razão).

Foram incluídos 78 indivíduos diabéticos (todos tipo 2), sendo 32 homens e 46 mulheres, com idade média de 54,9 anos (variando de 28 a 75 anos) e 42 controles, 18 homens e 25 mulheres, com idade média de 53,9 anos (variando de 30 a 78 anos).

Todos pacientes foram submetidos à avaliação hematológica para contagem de eosinófilos e dos diabéticos foi solicitada dosagem de hemoglobina glicosilada (imunoturbimetria). O diagnóstico da estrogiloidíase foi realizado através de exame parasitológico de fezes e uma amostra do soro foi estocada a -20°C para realização do diagnóstico imunológico através das

reações de Imunofluorescência indireta (IFI), ELISA, e *Western Blotting* (WB).

### 3.3. Parasitológico de fezes

Foram colhidas três amostras de fezes em dias consecutivos, de todos os pacientes estudados. As fezes foram coletadas em recipiente plástico, sem conservante e mantidas a 4°C, por no máximo 72 horas. O diagnóstico parasitológico foi realizado pelo método de Baermann-Moraes utilizando 10 g de fezes de cada amostra. Em seguida foi adicionada uma solução de formalina a 10% ao restante da amostra para que a análise pelo método de sedimentação de Hoffmann, Pons e Janer (1934) fosse feita posteriormente. Foram preparadas três lâminas para cada uma das 360 amostras pelo método de Baermann-Moraes e outras três lâminas para o método de sedimentação, sendo analisadas um total de 2160 lâminas em microscópio (Nikon-Japan) com aumento de 40 e 100 vezes e com o auxílio de dois examinadores.

### 3.4. Obtenção de *Strongyloides stercoralis*

Larvas rabditóides de *S. stercoralis* foram isoladas das fezes de um dos pacientes diabéticos e mantidas em cultura pelo método de Looss (1905), de onde 20.000 larvas L<sub>3</sub> foram então inoculadas em cães imunodeprimidos pela administração de Prednisolona na dose de 2 mg/Kg. As fezes obtidas destes cães experimentalmente infectados, foram misturadas a partes iguais de vermiculita ligeiramente umedecida e posteriormente colocadas em placas de Petri, onde permaneceram incubadas a 25° C durante cinco dias. As larvas L<sub>3</sub> foram então recuperadas de acordo com método de Baermann-Moraes, concentradas através de centrifugação a 350 giros durante cinco minutos e

mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem utilizadas.

### **3.5. Produção de antígenos de *S. stercoralis***

#### **3.5.1. Antígeno para o teste de Imunofluorescência Indireta**

As larvas filarióides obtidas conforme descrito anteriormente foram incluídas em "Tissue Tek®" e cortadas em criostato a  $-20^{\circ}\text{C}$ , em secções de quatro micra de espessura, conforme COSTA-CRUZ *et al.* (1997). Os cortes foram depositados em lâminas de microscopia, previamente desengorduradas com álcool-éter PA v/v à temperatura ambiente e conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. Foram utilizadas as lâminas que continham no mínimo cinco cortes de larvas visualizadas ao aumento de 200X.

#### **3.5.2. Antígeno salino para ELISA e Western blotting**

O extrato larvário foi obtido de 420 000 larvas filarióides de *S. stercoralis*, em 1 mL de solução salina tamponada com fosfato 0,15 M, pH 7,2 (PBS), homogeneizadas com homogeneizador de tecidos (Glas Col) a  $4^{\circ}\text{C}$  por cinco ciclos de cinco minutos cada e posteriormente rompidas para extração protéica através do ultra-som (Thorton, Inspec Eletrônica, São Paulo) em oito períodos de 20 segundos em banho de gelo. O material foi deixado sob agitação lenta por 18 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  e então centrifugado a 12.400 g durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , e o conteúdo protéico do sobrenadante foi dosado pelo método de Lowry *et al.* (1951). Foi obtida concentração de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em um volume de 2,5 mL.

### 3.6. Amostras dos soros

As amostras de sangue dos pacientes atendidos no ambulatório de endocrinologia foram colhidas no Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFG, centrifugadas a 3000 rpm durante cinco minutos e os soros, assim separados, foram estocados em alíquotas a 20° C negativos até o momento da utilização.

Como padrão positivo, foi utilizada uma amostra de soro de um paciente que estava eliminando larvas de *S. stercoralis* nas fezes e como padrões negativos, três amostras de soro foram obtidas de indivíduos sadios que foram negativos em três exames coproparasitológicos e tinham sorologias negativas para *S. stercoralis*.

### 3.7. Testes imunológicos

#### 3.7.1. Teste de Imunofluorescência Indireta

O teste de imunofluorescência indireta para detecção de IgG, foi realizado segundo previamente descrito (COSTA-CRUZ *et al.*, 1997). Amostras de soro controle positivo e negativo foram adicionadas às lâminas contendo os cortes de *S. stercoralis*, além dos soros a serem testados, na diluição de 1:20 em PBS 0.01M, pH 7.2. As lâminas foram então mantidas a 37°C durante 30 minutos e posteriormente foram lavadas três vezes em PBS durante cinco minutos e então adicionado conjugado anti-IgG humana marcado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma, USA) no título ideal de 100, diluído em azul de Evans 1% (Interlab, São Paulo). Após 30 minutos mantidas a 37°C, as lâminas foram novamente lavadas em PBS três vezes, durante cinco minutos, e montadas em glicerina tamponada pH 8,5 (Merck, Germany). As reações foram

avaliadas em microscópio de imunofluorescência (Zeiss Axiolab, Germany) equipado com lâmpada de halogênio. As amostras positivas (com título  $\geq 20$ ) foram novamente testadas em diluição seriada na razão 2.

### 3.7.2. Teste ELISA

O teste ELISA com antígeno salino de *S. stercoralis* foi realizado como descrito previamente (SILVA *et al.* 2003). Micro placas de poliestireno foram empregadas (DIFCO, Interlab, São Paulo) como suporte para adsorção de 50  $\mu\text{L}$  de antígeno de larvas  $L_3$  de *Strongyloides stercoralis* (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M , pH 9,6), mantidas a 4° C durante 18 horas em câmara úmida. Após três lavagens de cinco minutos cada com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), as placas foram incubadas com 50  $\mu\text{L}$  de soros padrão positivo e negativo e com os soros a serem testados diluídos 1:80 em PBS-T durante 45 minutos a 37°C. Os anticorpos não ligados foram lavados como descrito anteriormente. Foi adicionado, a seguir, 50  $\mu\text{L}$  de conjugado anti IgG humana marcada com peroxidase cadeia Fc específica, no título ideal de 2000 (Sigma) e incubadas por 45 minutos a 37°C. Após três lavagens de cinco minutos em PBS-T, a reação foi revelada com a adição de 50  $\mu\text{L}$  do substrato de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e solução cromógena de ortofenileno diamina (Merck, Germany) (10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% + 10 mg de OPD + 25 mL de tampão citrato fosfato pH 5,0). Após 15 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de 25  $\mu\text{L}$  de solução 2 N de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Merck). A reatividade foi determinada através da medida da densidade óptica a 492 nm em leitor ELISA (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA). O valor de "cut off" foi definido pela média aritmética acrescida de dois desvios-padrão, das

densidades ópticas das amostras de três soros padrão negativo (BASSI *et al.*, 1991). As amostras positivas (título  $\geq 80$ ) foram testadas novamente em diluição seriada na razão 2.

### 3.7.3. Teste de *Western blotting*

#### 3.7.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida

As proteínas somáticas do extrato salino de larvas L3 foram separadas através de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, segundo Laemmli (1970).

Para preparação do gel de separação foi utilizado: TRIS-HCl 0,375M, pH 8,8 (Sigma); dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,1% (Sigma); ácido-etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) 2mM, (Merck); solução de acrilamida a 29% e bisacrilamida (n,n'-metileno-bis-acrilamida) 0,8% (Sigma); água bidestilada; TEMED (n,n,n,n-tetrametil-aminometano) a 0,125%, (Sigma) e persulfato de amônio 0,125% (APS, Sigma).

A solução correspondente ao gel de separação foi colocada, lentamente, entre placas de vidro (10cm x 8cm) adequadamente seladas com solução de agar a 4% e espaçadores de teflon. Para evitar polimerização em presença de oxigênio, foi adicionada uma camada de butanol (Merck), que foi descartada logo após a polimerização completa do gel.

Em seguida, preparou-se o gel de empilhamento. Para esta solução foram utilizados: Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; SDS 0,1%, EDTA 2 mM; solução de acrilamida a 29% e bisacrilamida 1%; água bidestilada; TEMED 0,125% e APS 0,125%. O gel de empilhamento foi colocado sobre o gel de separação e

moldado por teflon para a formação de espaços para aplicação das amostras.

Após a polimerização completa do gel foi aplicada a amostra antigênica, previamente fervida por 2 minutos, em concentração de 5µg de proteínas por tira, aproximadamente. No momento do uso, o material antigênico foi diluído na proporção de 1:1 em tampão de amostra (sacarose a 20%, SDS 2%, EGTA 11mM, azul de bromofenol 0,25% (Pharmacia) e Tris 31 mM). Foram aplicados também, padrões peso molecular de 6,5 a 205 kDa (Sigma).

As placas de vidro foram encaixadas em cubas para eletroforese contendo tampão Tris-glicina 0,025M pH 8,3 e a migração das proteínas realizada em corrente de 25 mA e voltagem de 220V (Sistema Biorad, USA) por aproximadamente quatro horas.

### 3.7.3.2. Coloração do gel

A coloração do gel por nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), foi realizada segundo método Color prata de Friedman (1982) que destaca os polipetídeos em tons amarelo- ferrugem. O gel gradiente descrito anteriormente foi cuidadosamente mergulhado em solução fixadora contendo metanol 50% (Merck), ácido acético 12% (Industria Farmacêutica Rio-Química-São Paulo, Brasil), formaldeído a 0,05% (Quimibras Industrias Químicas S.A, Rio de Janeiro, Brasil) e água bidestilada por uma hora. Após esse tempo, removeu-se o fixador com etanol 50% em três banhos de 20 minutos cada. Em seguida foi feito um pré-tratamento com solução de tiosulfato de sódio penta hidratado ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) a 0,2% por um minuto. O gel foi então lavado três vezes durante 20 segundos com água bidestilada e impregnado com solução de formaldeído a 37%, água e nitrato de prata a 2%, ao abrigo da luz, durante 20 minutos. O gel

foi novamente lavado com água bidestilada em três ciclos de 20 segundos e revelado com solução contendo 3 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 25  $\mu\text{L}$  de formaldeído e 1 mL de tiosulfato de sódio penta hidratado a 0,2% (Merck) até o aparecimento da cor. A reação foi interrompida com solução de metanol a 50% e ácido acético glacial a 12%. O gel foi então colocado entre folhas de papel celofane para secar.

### 3.7.3.3. Realização do *Western blotting*

As proteínas somáticas do extrato salino de larvas L3 foram separadas através de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 12% contendo duodecil sulfato de sódio (SDS) e transferidas para membranas de nitrocelulose (Sigma) com porosidade de 0,45 $\mu\text{m}$  (LAEMMLI, 1970; TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). Foi preparado um "sandwich" com: seis folhas de papel de filtro (Munktell, Grau 1F, Pharmacia LKB), membrana de nitrocelulose, gel de poliacrilamida contendo as frações antigênicas e mais seis folhas de papel de filtro, todas umedecidas em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) e colocadas em uma cuba de transferência para aplicação de corrente elétrica de 120 mA a 250V durante duas horas. Terminada a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corado em solução de Ponceau S 0,5% (Sigma) em ácido acético 1%, para verificar a eficiência da transferência.

As membranas foram cortadas em tiras de 3 mm de largura, lavadas com água destilada e então bloqueadas com PBS-T adicionado a 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo) (PBS-TM) durante duas horas em temperatura ambiente sob agitação lenta. Após este período, a solução bloqueadora foi desprezada e às tiras de nitrocelulose foram adicionadas as

amostras de soro a serem testadas, diluídas 1:40 em PBS-TM 5% e incubadas por 18 horas a 4°C sob agitação horizontal lenta. Após ciclo de seis lavagens de cinco minutos cada com PBS-TM a 1%, as tiras foram incubadas com conjugado IgG cadeia total de cabra anti IgG humana ligado a peroxidase (Sigma) diluído 1:200 e mantidas em temperatura ambiente por duas horas. A revelação da reação foi feita através da adição de 5 mL de água destilada para cada pastilha de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma, USA) e outra pastilha de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% com tampão uréia durante cinco minutos. A reação foi interrompida por lavagens sucessivas das tiras com água destilada. Foram consideradas positivas as amostras de soro que tivessem pelo menos duas frações protéicas antigênicas consideradas imuno dominantes segundo trabalhos anteriormente publicados (GENTA *et al.*, 1988; SATO *et al.*, 1990; CONWAY *et al.*, 1993; LINDO *et al.*, 1994).

### **3.8. Tratamento**

Os pacientes que eliminaram larvas nas fezes foram tratados com ivermectina na dose de 20 µg/kg e o exame parasitológico de fezes foi repetido após o tratamento como controle de cura.

### **3.9. Análise estatística**

Os resultados do teste de *Western blotting* foram interpretados pelo programa computacional Excel 4.0, através de regressão linear utilizando a equação da reta e os cálculos das significâncias entre diferentes frequências que apresentaram erro máximo de 5% ( $p < 0,05$ ).

O software Epilinfo 2000 foi utilizado para calcular o *Odds Ratio* e o teste  $\chi^2$  com correção de Yates para verificar a significância das diferentes frequências observadas. O intervalo de confiança para o odds ratio foi calculado pelo método de Fleiss (1979). O teste t-student foi utilizado para comparação da média de idade entre os grupos. Foram considerados significantes valores de  $p < 0,05$ .

### **3.10. Normas de biossegurança**

Todo o procedimento de colheita e manuseio do material biológico e dos reagentes, bem como utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de segurança compatíveis (CHAVES-BORGES; MINEO, 1997).

*Resultados*

#### 4. RESULTADOS

A frequência de infecção pelo *S. stercoralis* foi maior entre os diabéticos, mas se considerarmos apenas a positividade do exame de fezes esta diferença não foi estatisticamente significativa. Apesar de dois examinadores analisarem 2160 lâminas pelos métodos de Baermann-Moraes e de Hoffmann, a positividade foi muito baixa. Além das larvas de *S. stercoralis*, o parasitológico de fezes detectou ovos de ancilostomídeo (um caso) e outro de *Giardia lamblia*. Ambos os casos ocorreram no grupo dos diabéticos em duas pacientes do sexo feminino e nenhuma delas tinha mais de um parasita detectado pelo exame coproparasitológico.

Os grupos não eram diferentes quanto ao sexo ou idade e foram selecionados entre os pacientes atendidos em um mesmo ambulatório de endocrinologia. Os indivíduos do grupo controle eram portadores de obesidade (28,5%), hipotireoidismo tratado (33,3%), hipertireoidismo (16,7%), bócio multinodular atóxico (9,5%), dislipidemia (4,8%) e o restante (7,2%) hiperprolactinemia, acromegalia e nódulo tiroideano (1 caso de cada uma das patologias).

A tabela 1 mostra as características destes grupos e a frequência de infecção pelo *S. stercoralis* observada em cada um deles, além do *odds-ratio*.

Os três pacientes cujo exame parasitológico de fezes evidenciou a presença de larvas de *S. stercoralis* foram positivos também pela IFI, ELISA e *Western blotting*. A sensibilidade do exame de fezes se mostrou muito baixa, sendo que 18 dos 21 pacientes cujas sorologias foram positivas tinham coproparasitológico negativo. Curiosamente, um dos pacientes com exame de

fezes positivo e com grande número de larvas L<sub>2</sub> (que foram utilizadas para cultura, infecção de cães e obtenção das larvas L<sub>3</sub>) apresentou duas amostras consecutivas negativas e somente na terceira amostra houve a eliminação das larvas. Neste caso houve eosinofilia de 16% no hemograma, fato este de ocorrência isolada, uma vez que a contagem de eosinófilos dos demais pacientes foi normal. Outro paciente com exame de fezes positivo para *S. stercoralis* tinha como sintoma diarreia intermitente e eosinofilia de 5%, o terceiro caso era totalmente assintomático.

**Tabela 1-** Característica do grupo de diabéticos e dos controles quanto à idade, sexo e freqüência de infecção pelo *S. stercoralis*.

Variáveis	Diabéticos (n=78)	Controles (n=42)	P	OR (IC)
Idade (média)	54,1 ± 11,9	53,9 ± 10,7	NS	-
Homens	32 (41%)	17 (40,5%)	NS	-
Mulheres	46 (59%)	25 (59,5%)	NS	-
Parasitológico de fezes positivo	3 (3,8%)	0	NS	-
Sorologia positiva	18 (23%)	3 (7,1%)	<0,05	3,5 (1,6-15,9)

NS: não significante OR: Odds-ratio IC: intervalo de confiança para 95% de significância

A Tabela 2 mostra as características dos pacientes com exames positivos, o nível de controle metabólico através da hemoglobina glicosilada, bem como os títulos encontrados nas reações de IFI e ELISA, além das frações protéicas identificadas pelo WB.

**Tabela 2:** Características dos 21 pacientes positivos para *S. stercoralis* quanto ao sexo, idade, diagnóstico da doença endócrina, coproparasitológico, nível de hemoglobina glicosilada (somente para os diabéticos), titulação das reações de IFI e ELISA e frações protéicas detectadas pelo WB.

Sexo	Idade	Diagnóstico	Coproparasitológico	HbA1c	IFI	ELISA	Frações protéicas (kDa)
F	60	Diabetes	Positivo	9,2%	40	160	17,20,30,87,90
M	63	Diabetes	Positivo	9,6%	20	1280	17,20,30,40,55
M	51	Diabetes	Positivo	10%	40	320	20,23,25,30,90
F	62	Diabetes	Negativo	8%	40	160	50,55,66,78
F	50	Diabetes	Negativo	7%	20	80	55,66,90
M	39	Diabetes	Negativo	6%	Neg	80	23,25,40,55,66
F	64	Diabetes	Negativo	12,4%	20	80	40,66
F	46	Diabetes	Negativo	10%	40	160	17,20,30,78,90
M	48	Diabetes	Negativo	10,2%	20	320	40,78,90
F	78	Diabetes	Negativo	5,8%	40	2560	14,17,20,25,55,66,90
F	52	Diabetes	Negativo	7%	40	2560	17,20,25,55,66,90
M	53	Diabetes	Negativo	6,0%	20	2560	17,30,40,55,90
M	45	Diabetes	Negativo	9,9%	20	640	31,90
F	75	Diabetes	Negativo	7,9%	20	80	60,66,90
M	62	Diabetes	Negativo	6,2%	40	320	90,78,25,20,17,13
M	54	Diabetes	Negativo	6,3%	Neg	160	90,66,55,40,25,20,17
F	47	Diabetes	Negativo	11,4%	20	160	90,66,55,25,20,17
F	60	Diabetes	Negativo	7,5%	Neg	80	17,20,31,85
M	75	Hipotiroidismo	Negativo	NR	20	320	31,40,41
F	52	Hipotiroidismo	Negativo	NR	40	2560	17,20,25,55,66,90
F	64	Hipotiroidismo	Negativo	NR	20	160	23,25,31,87

NR: não realizado

HbA1c: hemoglobina glicosilada

A análise destes resultados quanto ao sexo não mostrou diferença estatisticamente significativa. A infecção pelo *S. stercoralis* foi detectada em 18,3% dos homens e em 16,9% das mulheres ( $p>0,05$ ). A média de idade dos pacientes positivos foi de 59,2 anos para as mulheres e de 54,4 anos para os homens.

A Tabela 3 mostra os resultados concordantes e discordantes dos três testes imunológicos realizados. Observou-se concordância dos testes em 79,5% dos diabéticos e em 71,4% dos controles. O teste de *Western Blotting* definiu o diagnóstico como negativo, mesmo quando IFI e/ou ELISA foram positivos, se não foram encontradas pelo menos duas frações protéicas imunodominantes. Dos 18 pacientes diabéticos considerados positivos para *S. stercoralis*, 15 tiveram os três testes sorológicos positivos e apenas três foram negativos pela IFI. Nos controles, dos três casos considerados positivos, todos foram concordantes.

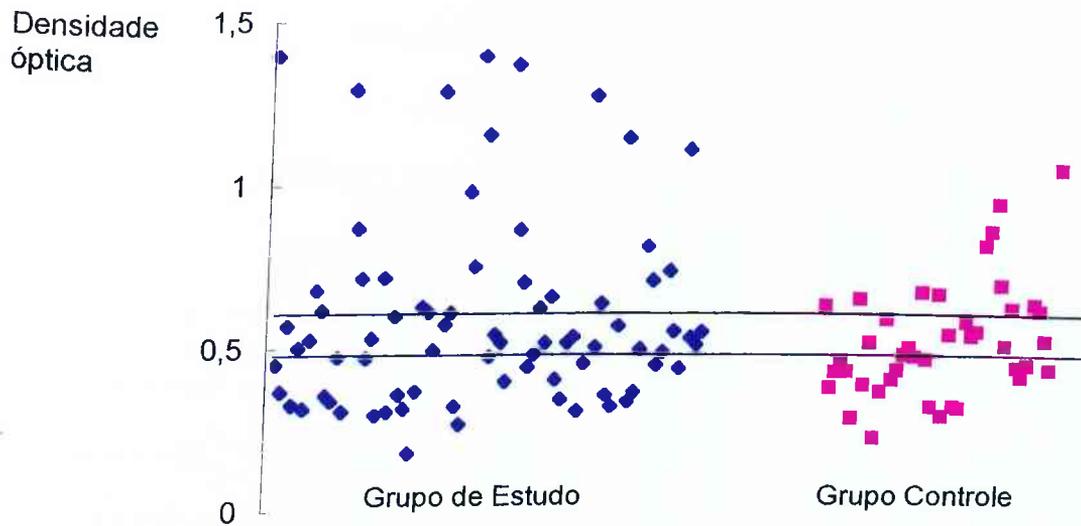
A figura 1 mostra os valores de absorbância obtidos pelo teste ELISA. O valor de corte foi de 0,545 para o soro na diluição inicial de 1:80. Quando considerada a zona cinza, que varia de -10% a + 10% do valor de corte, três das cinco amostras que foram positivas também pela IFI e negativos no WB encontraram-se nesta zona.

**Tabela 3-** Análise comparativa dos resultados dos testes de IFI, ELISA e *Western blotting* para *S. stercoralis* em 78 pacientes diabéticos e 42 controles.

Resultados	Métodos	Diabéticos	Controles
		n (%)	n (%)
Concordantes	IFI+/ ELISA+/ WB+	15 (19,2)	3 (7,1)
	IFI-/ ELISA -/ WB-	47 (60,3)	27 (64,3)
Discordantes	IFI +/ ELISA+/WB-	4 (5,2)	1 (2,4)
	IFI+/ ELISA- /WB-	0	0
	IFI+/ ELISA- /WB+	0	0
	IFI-/ ELISA+ /WB+	3 (3,8)	0
	IFI-/ ELISA- /WB+	0	0
	IFI-/ ELISA+/ WB-	9 (11,5)	11 (26,2)
Total		78 (100)	42 (100)

(+) teste positivo      (-) teste negativo

A figura 2 apresenta a reatividade de anticorpos IgG a componentes antigênicos de *S. stercoralis* em amostras de soros de pacientes positivos pelo parasitológico de fezes e pelos três métodos de diagnóstico sorológicos, pacientes positivos apenas pelos três métodos sorológicos (concordantes positivos), positivos pelo WB embora com IFI ou ELISA negativos (discordantes) e negativos tanto pelo parasitológico de fezes como pelos três métodos imunodiagnósticos (concordantes negativos).



**Figura 1.** Níveis de IgG, expressos em densidade óptica (DO) das amostras de soro utilizando extrato salino de *S. stercoralis* em 78 pacientes diabéticos e 42 controles. As linhas indicam o limiar de positividade (0,545) acrescido de 10% acima e abaixo (zona cinza).



Dentre os indivíduos diabéticos, objetivando avaliar se houve uma maior chance de ocorrência da infecção pelo *S. stercoralis* naqueles com controle metabólico inadequado, foi feita uma correlação entre a frequência da infecção e os níveis de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>). A HbA<sub>1c</sub> constitui-se, atualmente, no melhor parâmetro para avaliar o controle metabólico crônico, uma vez que através dela temos uma média dos valores de glicemia no período de aproximadamente 120 dias. A tabela 4 mostra estes resultados. Se levamos em consideração os diabéticos com infecção pelo *S. stercoralis*, observa-se uma frequência maior no subgrupo com hemoglobina glicosilada maior que 7%. Além disso, aqueles diabéticos considerados negativos para a infecção eram, em sua maioria, pertencentes ao subgrupo cuja HbA<sub>1c</sub> define um bom controle metabólico (OR=1,5, p>0,05).

**Tabela 4-** Estratificação do grupo de diabéticos (n=78) quanto ao controle metabólico (nível de hemoglobina glicosilada) e a frequência de infecção pelo *S. stercoralis* diagnosticada através dos testes de IFI, ELISA e WB.

Diabéticos	<i>Strongyloides stercoralis</i>		Total n (%)
	Sorologia positiva n (%)	Sorologia negativa n (%)	
HbA <sub>1c</sub> ≤ 7 % (bem controlados)	7 (9)	32 (41)	39 (50)
HbA <sub>1c</sub> > 7 % (mal controlados)	11 (14,1)	28 (35,9)	39 (50)
Total	18 (23,1)	60 (76,9)	78 (100)

*Discussão*

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados demonstraram uma maior frequência de infecção pelo *S. stercoralis* em indivíduos diabéticos do que nos controles.

Em qualquer estudo tipo caso-controle, é importante questionar se a associação observada pode ter resultado de *bias*, ou na seleção dos pacientes, ou na capacidade do método diagnóstico empregado em detectar a doença quando esta estiver presente (MARASCIULO; NASSAR, 1999). Na amostra estudada, não foram avaliados parâmetros sócio-econômicos e nível de escolaridade. Contudo, tanto os diabéticos como os controles foram selecionados dentre os pacientes atendidos pelo ambulatório do Hospital Universitário, que é um serviço público e atende pessoas de classes sócio-econômicas mais baixas. Em relação aos demais parâmetros como sexo e idade, os grupos não mostraram diferença. Quanto ao *bias* de diagnóstico da infecção, o método de inclusão dos pacientes permitiu que ambos os grupos tivessem a mesma chance de detecção da doença, já que tanto o parasitológico de fezes como as sorologias foram realizadas em todos os pacientes incluídos na análise, inclusive o mesmo número de amostras das fezes foram coletadas dos dois grupos.

A positividade dos exames de fezes foi muito baixa nos dois grupos. Isto ocorre, em primeiro lugar, devido à baixa sensibilidade do exame parasitológico em detectar a presença de larvas. Sabe-se que, principalmente em regiões endêmicas para estrogiloidíase, como ocorre em Uberlândia, a cronicidade da infecção leva à eliminação de pequena quantidade de larvas (menos de 25

larvas/g de fezes) e com periodicidade variável. A coleta de um maior número de amostras de fezes pode aumentar a possibilidade de diagnóstico (LIU; WELLER, 1993; SATO *et al.*, 1995; UPARANUKRAW; PHONGSRI; MORAKOTE, 1999; Van der FELTZ *et al.*, 1999; SIDDIQUI; BERK, 2001; SUDARSHI *et al.*, 2003). No entanto, apesar de coletadas três amostras de fezes para cada paciente, ainda assim não foi possível melhorar a sensibilidade do exame.

Com objetivo de diagnosticar os casos não detectados pelo parasitológico de fezes, optou-se por acrescentar o imunodiagnóstico, através das reações de IFI, ELISA e *Western blotting*. Observou-se uma frequência maior de anticorpos IgG contra larvas de *S. stercoralis* no grupo dos diabéticos. A validade do imunodiagnóstico na estrogiloidíase é bem documentada na literatura médica e dentre eles o teste ELISA se coloca como sendo, atualmente, o de maior sensibilidade e especificidade (de MESSIAS *et al.*, 1987; GAM; NEVA; KROTOSKI, 1987; GENTA *et al.*, 1988; LINDO *et al.*, 1994; van der FELTZ *et al.*, 1999; DILIP, 2001; LOUFTY *et al.*, 2002; MERCADO *et al.*, 2002; FERREIRA; COSTA- CRUZ, 2003; SUDARSHI *et al.*, 2003), com índices variando de 83,8% a 94,6% e 90,2% a 100% respectivamente. Quando comparada ao *gold-standard*, ou seja, ao achado microscópico das larvas nas fezes, a sensibilidade dos testes sorológicos para estrogiloidíase é maior em populações cronicamente expostas à infecção pelo *S. stercoralis*, do que em pessoas que se infectaram durante um breve período de exposição (SUDARSHI *et al.*, 2003). Os testes sorológicos não podem distinguir entre infecções presentes ou passadas, e embora os títulos de IgG tendam a cair com a erradicação do parasita, muitos indivíduos permanecem soropositivos

por um longo período após a cura da infecção (LIU; WELLER, 1993; LINDO *et al.*, 1996; SUDARSHI *et al.*, 2003). Apesar destas limitações, testes sorológicos para estrogiloidíase tem sido propostos como *screening* para populações de risco (DILIP, 2001; de SILVA *et al.*, 2002; LOUFTY *et al.*, 2002; SUDARSHI *et al.*, 2003).

Houve uma grande concordância entre os três métodos utilizados e embora haja possibilidade de reação cruzada do teste ELISA com esquistossomose e com filariose, a utilização do *Western blotting* nos casos duvidosos aumentou a especificidade dos resultados apresentados. No entanto, nossa região está distante 2.500 Km da área endêmica para filariose o que aumenta muito o valor preditivo negativo dos testes diagnósticos.

Não se tem uma explicação definitiva para a maior ocorrência de testes positivos para estrogiloidíase nos diabéticos. Apesar da grande quantidade de estudos que avaliaram a resposta imunológica do paciente diabético, é impossível a comparação dos resultados, e ainda hoje existem muitas dúvidas se o diabetes, isoladamente, pode levar a alterações específicas da resposta imune e de como isto poderia predispor a um maior risco de infecções (BESSMAN; SAPICO, 1992; SENTOCHNIK; ELIOPOULOS, 1994). A função das células polimorfonucleares foi estudada amplamente, com resultados discordantes. Um estudo (MOWAT; BAUM, 1971) demonstrou diminuição da quimiotaxia em indivíduos diabéticos descompensados, mas não houve alteração naqueles pacientes com hemoglobina glicosilada normal. Diminuição da fagocitose em diabéticos, principalmente com valores de glicemia acima de 250 mg/dl também foi descrita (BAGDADE; ROOT; BULGER, 1974). Com relação à resposta imune celular, não há concordância se o número e função

das células T em diabéticos é aumentado, diminuído ou normal (POZZILL; PAGANI; ARDUINI, 1987; VALERIUS; EFF; HANSEN, 1982). Defeito na produção de interleucina-2 e diminuição na resposta das células *natural killer* ao interferon foram relatados em pacientes diabéticos insulino dependentes (KAYE; ADRI; SOELDER, 1986; GIORDANO; GALLUZO; MARCO, 1988; NEGISHI; GUPTA; CHANDY, 1988). Mesmo com tantas discordâncias quanto à resposta imune no diabetes, algumas infecções estão fortemente associadas com a doença, como: mucormicose, otite externa maligna, pielonefrite enfisematosa, colecistite enfisematosa e possivelmente as cistites, bacteriúrias e candidíase vulvovaginal (SENTOCHNIK; ELIOPOULOS, 1994).

Dentre os oito casos publicados de estrogiloidíase disseminada em indivíduos diabéticos, cinco (VENTURI; VILLOTTI, 1984; HIGASHIYAMA *et al.*, 1997; HO *et al.*, 1997; AL SAMMAN; HAQUE; LONG, 1999; EMAD, 1999) ocorreram em pacientes que tinham diabetes mellitus como única doença anterior e um deles teve evolução fatal (HO *et al.*, 1997). Um destes casos relatados (EMAD, 1999) tratava-se de um derrame pleural eosinofílico e neste paciente três exames de fezes colhidos em diferentes dias foram negativos. Os outros três casos descritos de formas graves de infecção pelo *S. stercoralis* (DEBUSSCHE *et al.*, 1988; COOVADIA; RAJPUT; BHANA, 1993; LINDER *et al.*, 2000) tinham alguns outros fatores, além do diabetes, que podem ter contribuído para a disseminação. Um dos pacientes relatados (COOVADIA; RAJPUT; BHANA, 1993) tinha história progressiva de etilismo crônico e nos outros dois casos havia associação com uso de corticóide em um deles (LINDER *et al.*, 2000) e com injeção de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) e uso de Ranitidina no outro (DEBUSSCHE *et al.*, 1988). Neste último relato, os autores sugerem que o

diabetes mal controlado pode ser um fator de risco para a forma grave da doença, em portadores crônicos muitas vezes assintomáticos. O relato descrito por Coovadia, Rajput e Bhana (1993) é apresentado, pelos autores, como o primeiro caso de estrogiloidíase disseminada em diabético publicado na literatura inglesa.

Embora um estudo controlado realizado na Turquia (NAZLIGUL; SABUNCU; OZBILGE, 2001) não tenha mostrado uma maior predisposição para ocorrência de parasitose intestinal em diabéticos, o diagnóstico parasitológico foi feito com apenas uma amostra de fezes e não houve relato de nenhum caso positivo para *S. stercoralis*. Davidson, Fletcher e Chapman (1984) procuraram avaliar os fatores de risco para estrogiloidíase em um modelo de estudo tipo caso-controle e não encontraram associação entre a infecção pelo *S. stercoralis* e o diabetes mellitus. No entanto, foram avaliados apenas 28 pacientes, entre os quais a ocorrência de diabetes foi também muito baixa, diminuindo a chance de detectar esta associação, se ela estivesse presente.

Este estudo evidenciou uma associação entre diabetes e testes sorológicos positivos para *S. stercoralis* e demonstrou ainda que o exame de fezes, isoladamente, parece inadequado como *screening* para estrogiloidíase. Considerando que existem casos relatados de disseminação da estrogiloidíase em diabéticos e que há uma freqüência maior de formas assintomáticas da doença neste grupo, a utilização de testes imunodiagnósticos poderia auxiliar na decisão terapêutica deste grupo de pacientes, principalmente naqueles que forem se submeter à quimioterapia ou corticoterapia.

*Conclusões*

## 6. CONCLUSÕES

- ❖ A frequência de infecção pelo *Strongyloides stercoralis* diagnosticada através de métodos imunológicos é maior em pacientes diabéticos comparado com os controles.
- ❖ A grande maioria dos pacientes é portador crônico assintomático.
- ❖ Os testes sorológicos são opções no *screening* da infecção pelo *S. stercoralis*, uma vez que o exame de fezes possui uma sensibilidade muito baixa.
- ❖ Considerando-se a alta eficácia e a baixa toxicidade das drogas atualmente usadas para o tratamento da estrogiloidíase, pacientes diabéticos deveriam ser tratados sempre que tiverem sorologia positiva associada a sintomas gastro-intestinais e eosinofilia.

*Resumo*

## 7. RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a freqüência de infecção pelo *Strongyloides stercoralis* em indivíduos diabéticos, comparando-a com um grupo controle. Para isto, foram avaliados 78 pacientes diabéticos com idade média de  $54,1 \pm 11,9$  anos e 42 controles ( $53,9 \pm 10,7$  anos) atendidos no ambulatório de Endocrinologia da Universidade Federal de Uberlândia. O diagnóstico da estrogiloidíase foi feito através de exames de fezes pelos métodos de Baermann-Moraes e Hoffmann, em três amostras colhidas em dias consecutivos. O diagnóstico imunológico foi realizado através das reações de Imunofluorescência indireta, ELISA e *Western Blotting* utilizando extrato salino de *S. stercoralis* para dosagem de IgG. A freqüência de infecção pelo *S. stercoralis* entre os diabéticos foi de 23% e nos controles foi de 7,1% ( $p < 0,05$ ). O odds-ratio para o grupo dos diabéticos foi de 3,5 (IC, 1,6-15,9,  $p < 0,05$ ). Houve também concordância dos resultados entre os métodos de diagnóstico imunológico em mais de 70% para ambos os grupos. Pacientes diabéticos com bom controle glicêmico tiveram menor risco de infecção pelo *S. stercoralis* (OR=1,5,  $p > 0,05$ ).

Conclui-se que a freqüência de infecção pelo *S. stercoralis* é maior em pacientes diabéticos comparado com os controles e que o exame de fezes isoladamente é pouco sensível para o diagnóstico de formas crônicas assintomáticas. Uma vez que existem casos relatados de disseminação da estrogiloidíase em diabéticos e que há uma freqüência maior de formas assintomáticas da doença neste grupo o *screening* destes pacientes de risco, através do imunodiagnóstico, pode vir a ser um auxiliar na decisão terapêutica.

*Abstract*

## 8. ABSTRACT

The purpose of the study was to determine the frequency of *Strongyloides stercoralis* infection in diabetic patients and in a control group. A total 78 diabetic patients with a mean age of  $54.1 \pm 11.9$  years and 42 controls (mean age  $53.9 \pm 10.9$  years) from the endocrinology ambulatory of the Federal University of Uberlândia were evaluated. For strongyloidiasis diagnosis, Baermann-Moraes and Hoffman methods were used in three fecal samples from each subject. For immunological diagnosis, the indirect immunofluorescence, ELISA and Western Blotting methods were used, with saline extracts from *S. stercoralis* to IgG dosage. The frequency of *S. stercoralis* infection in diabetics was 23% and 7.1% in the control group ( $p < 0.05$ ). The odds-ratio for diabetics was 3.9 (CI, 3,2-11,6,  $p < 0,05$ ). There was an agreement between the immunological methods used for the diagnosis in up to 70% of cases in both groups. Diabetic patients with good metabolic control were at a small risk for *S. stercoralis* infection (OR:0.5,  $P > 0.05$ ).

The frequency of *S. stercoralis* infection is higher in diabetic patients than it is in the controls and stool examination alone is poorly sensitive in diagnosing chronic asymptomatic patients. Once there are related cases of disseminated strongyloidiasis in diabetics and there is a higher frequency of asymptomatic presentation of the infection in this group, the immunological screening of these patients at risk, could be an important clue for therapeutic decision.

## *Referências Bibliográficas*

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIKENS, L.M., SCHAD, G.A. Radiolabelling of infective third-stage larvae of *Strongyloides stercoralis* by feeding [<sup>35</sup>Se] *Escherichia coli* to first and second stage larvae. **Journal of Parasitology**, v.75, p.735-739, 1989.
- ANDRADE NETO, J.L., ASSEF, M.C.V. Estrongiloidíase. In: VERONESI, R., FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. ed. Atheneu, 1996. 1803 p., p.1373-1378.
- AI SAMMAN, M.; HAQUE, S.; LONG, J.D. Strongyloidiasis colitis: A case report and review of the literature. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 28, p. 77-80, 1999.
- BAGDADE J.D., ROOT, R.K., BULGER, R.J. Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. **Diabetes**, v. 23, p. 9-15, 1974.
- BAERMANN, G. Eine Einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomun (Nematoden) Larven in Erdpnoben. Mededeel. nnith. in Geneesk. **Laboratories Weltreue Feestbundel, Batavia**, p. 41-47, 1917.
- BALASOIU, D.; VAN KESSEL, K.C.; VAN KATS-RENAUD, H.J.; COLLET, T.J.; HOEPELMAN, A.I. Granulocyte function in women with diabetes and asyntomatic bacteriuria. **Diabetes Care**, v.20, p. 392-395, 1997.
- BASSI G.E., ISHIKI, D.K., FERREIRA, A.W., CAMARGO, M.E. A reação imunoenzimática para cisticercose no líquido cefalorraquiano- considerações sobre o limiar limiar de reatividade. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 27, p. 49-52, 1991.
- BESSMAN, A.N.; SAPICO, F.L. Infections in the diabetic patient: the role of immune dysfunction and pathogen virulence factors. **Journal of Diabetes Complications**, v. 6, p. 258-262, 1992.
- CARVALHO, E.M., ANDRADE, T.M., ANDRADE, J.A., ROCHA, H. Immunological features in different clinical forms of strongyloidiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 3, p. 346-349, 1983.
- CHAVES-BORGES, F.A, MINEO, J.R. **Medidas de biossegurança em laboratórios**. Uberlândia: gráfica da Universidade Federal de Uberlândia, 1997, 55p.

- 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, p. 784-787, 1993.
- COOVADIA, Y.M.; RAJPUT, M.C.; BHANA, R.H. Disseminated strongyloidiasis in a diabetic patient. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 45, n. 4, p. 179-180, 1993.
- COSTA-CRUZ, J.M. *Strongyloides stercoralis*. In: NEVES, D.P., MELO, A.L., GENARO, O., LINARDI, P.M. **Parasitologia humana**. 10 ed. São Paulo, Atheneu, 2000.428p. p. 247-256.
- COSTA-CRUZ, J.M.; FERREIRA, M.S.; ROSSIN, I.R. Intestinal parasites in AIDS and + HIV patients in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 685-686, 1996
- COSTA-CRUZ, J.M, BULLAMAH, C.B., GONÇALVES-PIRES, M.R.F., 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, p. 313-317, 1997.
- DAVIDSON, R.A., FLETCHER, R.H., CHAPMAN, L.E. Risk factors for strongyloidiasis. A case-control study. **Archives of Internal Medicine**, v. 144, n. 2, p. 321-324, 1984.
- de MESSIAS, I.T., TELLES, F.Q., BOARETTI, A.C., SLIVA, S., GUIMARRES, L.M., GENTA, R.M. Clinical, immunological and epidemiological aspects of strongyloidiasis in an endemic area of Brazil. **Allergology and Immunopathology (Madri)**, v. 15, n. 1, p. 37-41, 1987.
- de SILVA, S.; SAYKAO, P.; KELLY, H.; MACINTYRE, C.R.; RYAN, N.; LEYDON, J.; BIGGS, B.A. Chronic *Strongyloides stercoralis* infection in Laotian immigrants and refugees 7-20 years after resettlement in Australia. **Epidemiology and infection**, v.128, p. 439-444, 2002.
- DEBUSSCHE, X., TOUBLANC, M., CAMILLIERI, J.P., ASSAN, R. Overwhelming strongyloidiasis in a diabetic patient following ACTH treatment and Keto- acidosis. **Diabete Metabolism (Paris)**, v.14, n.3, p. 294-298, 1988.
- DELAMAIRE, M.; MAUGENDRE, D.; MORENO, M.; LE GOFF, M.C.; ALLANNIC, H.; GENETET, B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. **Diabetes and Medicine**, v.14, p. 29-34, 1997.
- DILIP, N. Screening for *Strongyloides* infection among the institutionalized mentally disabled. **Journal of the American Boarding Family Practice**, v. 14, p. 51-53, 2001.

- DREYER, G., FERNANDES-SILVA, E., ALVES, S., ROCHA, A., ALBUQUERQUE, R., ADDISS, D. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens- Implications for the diagnosis and clinical trials. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2568-2571, 1996.
- EMAD, A. Exsudative eosinophilic pleural effusion due to *Strongyloides stercoralis* in a diabetic man. **Southern Medical Journal**, v. 92, n. 1, p. 58-60, 1999.
- FAUST, E.C.; SAWITZ, W.; TOBIE J. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminthes in feces. **Journal of Parasitology**, v. 25, p. 241-262, 1939
- FERREIRA, M.S. Estrongiloidíase. IN: VERONESI, R., FOCACCIA, R., DIETZE, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**, 8. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. p. 856-865.
- FERREIRA, M.S.; COSTA-CRUZ, J.M. Estrongiloidíase. IN: CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. **Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, Atheneu: 2003, p.241-251.
- FERREIRA, M.S., NISHIOKA, S.A., BORGES, A.S., COSTA-CRUZ, J.M., ROSSIN, I.R., ROCHA, A., SILVESTRE, M. T. A., NUNES- ARAÚJO, R.F. Strongyloidiasis and infection due to human immunodeficiency virus: 25 cases at a brasilian teaching hospital, including seven cases of hyperinfection syndrome. **Clinics in Infectious Diseases**, v.28, p. 154-155, 1999.
- FLEISS, J.L. Confidence intervals for the odds ratio in case-control studies: The state of the art. **Journal of chronic diseases**, v. 32, p. 69-77, 1979.
- FOGAÇA, H.S., ELIA, C.C.S., MADI, K., OLIVEIRA, A. Estudo das imunoglobulinas intestinais na estrongiloidíase. **A Folha Médica**, v.101, n. 4, p. 229-235, 1990.
- FRIEDMAN, R.D. Comparison of four different silver-staining techniques for salivary protein detection in alkaline poliacrilamid gels. **Annals of Biochemistry**, v.126, p. 346-349, 1982.
- 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, p. 157-161, 1987.
- GENTA R.M. Predictive value of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of strongyloidiasis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 89, p. 91-94, 1988.
- GENTA, R.M. Global prevalence of strongyloidiasis: critical review with epidemiologic insights into the prevention of disseminated disease. **Review in Infectious Dieases**, v.11, n. 5, p. 755-767, 1989.

GENTA R.M.; GATTI, S.; LINKE, M.J.; CEVINI, C.; SCAGLIA, M. Endemic strongyloidiasis in northern Italy: Clinical and immunological aspects. **Quarterly Journal of Medicine**, v. 257, p. 679-690, 1988.

GIORDANO, C., GALLUZO, A., MARCO, A. Increased soluble interleukin-2 receptor levels in the sera of type I diabetic patients. **Diabetes Research**, v. 8, p. 135-138, 1988.

GONÇALVES, E.G., FERREIRA, M.S. Aspectos radiológicos do comprometimento pulmonar na estrogiloidíase disseminada. **Radiol. Bras.**, v. 17, n. 3, p. 172-175, 1984.

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

GRYSCHKEK, R.C., AMATO-NETO, V., MATSUBARA, L., CAMPOS, R. Fraco desempenho do albendazol no tratamento da estrogiloidíase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, p. 205-206, 1992.

HACKFORD, A.W. Mesenteric ischemia in strongyloidiasis hyperinfection syndrome. **Infections in Medicine**, v. 11, n. 2, p. 19-31, 1994.

HIGASHIYAMA, Y.; SAKATA, H.; OBASE, Y.; SAKATA, S.; SHIMAFUJI, T.; MORI, M.; ISHINO, T.; KOHNO, S.; SAITO, A.; HARA, K. A case of bacterial meningitis induced by strongyloidiasis. **Kansenshogaku Zasshi**, v. 71, p. 680-683, 1997.

HO, P.L.; LUK, W.K.; CHANT, A.C.; YUEN, K.Y. Two cases of fatal strongyloidiasis in Hong Kong. **Pathology**, v. 29, p. 324-326, 1997.

HOFFMANN, W.A., PONS, J.A., JANER, J.L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni, Puerto Rico. **Journal of Public Health and Tropical Medicine**, v.9, p. 283-291, 1934.

HUGGINS, D.; MEDEIROS, L.B.; TAVARES, E.; MALTA, L.B.L.; AGUIAR, T.C. Tratamento da estrogiloidíase humana e outras parasitoses intestinais com dose única de ivermectina. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 58, p. 168-170, 2001.

KAYE, W.A., ADRI, M.N., SOELDER, J.S. Acquired defect in interleukin-2 production in patients with type I diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**, v. 315, p. 920-924, 1986.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 15, p. 680-685, 1970.

LEÃO, R.C., BARROS, M.M.T., MENDES, E. Immunological study of human strongyloidiasis. Analysis of IgE levels. **Allergology and Immunopathology**, v. 8, p. 31-34, 1980.

LINDER, J.D.; MONKEMULLER, K.E.; LAZENBY, A.J.; WILCOX, C.M. *Streptococcus bovis* bacteremia associated with *Strongyloides stercoralis* colitis. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 52, p. 796-798, 2000.

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, p. 175-179, 1994.

LINDO, J.F., ATKINS, N.S., LEE, M.G., ROBINSON, R.D., BUNDY, D.A.P. Parasite-specific serum IgG following successful treatment of endemic strongyloidiasis using ivermectin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p.702-703, 1996.

LISBOA, H.R.K., SOUILLJEE, M., CRUZ, C.S., ZOLETTI, L., GOBBATO, D.O. Prevalência de hiperglicemia não diagnosticada nos pacientes internados nos hospitais de Passo Fundo, RS. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 44, n. 3, p. 220-226, 2000.

LIU, L.X., WELLER, P.F. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v.7, n. 3, p. 655-82, 1993.

LOOSS A. Die Wan derung der Ancylostomum and Strongyloides Larven von der Haut anchdem Darm. **C R 6<sup>e</sup> Congrès intern Zoologic**, Geneève, 1904, p. 225-233, 1905.

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.749-752, 2002.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 29, p. 265-275, 1951.

MACHADO, E.R., COSTA-CRUZ, J.M. *Strongyloides stercoralis* and other enteroparasites in children at Uberlandia city, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, n. 2, p. 161-164, 1998.

MANSFIELD, L.S., ALAVI, A., WORTMAN, J.A., SCHAD, G.A. Gamma camera scintigraphy for direct visualization of larval migration in *Strongyloides stercoralis*- infected dogs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.52, p. 236-40, 1995.

MANSFIELD, L.S., NIAMATALI, S., BHOPALE, V., VOLK, S., SMITH, G., LOK, J.B., GENTA, R.M., SCHAD, G.A. *Strongyloides stercoralis*: maintenance of exceedingly chronic infections. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 6, p. 617-624, 1996.

MARASCIULO, A.C.E., NASSAR, S.M. Conceitos básicos em bioestatística e em epidemiologia clínica. In: DRUMMOND, J.P., SILVA, E. **Medicina baseada em evidências**. 1 ed. São Paulo, Atheneu, 1999. 158p. p.23-59.

MENDONÇA, S.C.L., JORGE, P.T. Prevalência de dislipidemia em uma população com mais de 50 anos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.41, n. 4, p. 183-187, 1997.

MERCADO, R.; JERCIC, M.I.; TORRES, P.; ALCAYAGA, S.; MARTINS de PAULA, F.; COSTA-CRUZ, J.M.; UETA, M.T. Immunodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infections in Chile using ELISA test. **Revista Medica Chilena**, v. 130, p. 1358-1364, 2002.

MILDER, J.E., WALZER, P.D., KILGORE, G., RUTHERFORD, I., KLEIN, M. Clinical features of *Strongyloides stercoralis* infection in an endemic area of the United States. **Gastroenterology**, v. 80, p. 1481-1488, 1981.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Assistência à Saúde, Departamento de Assistência e Promoção à Saúde, Coordenação de doenças crônico-degenerativas. **Estudo Multicêntrico sobre a Prevalência do Diabetes Mellitus no Brasil - Censo de Diabetes**. Brasília: Ministério da Saúde, 1988

MORAES, R.G. Contribuição para o estudo de *Strongyloides stercoralis* e da estrombiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, v.1, p.507-624, 1948.

MOUSCHEN, M.P.; SCHEEN, A.J.; LEFEBVRE, P.J. Impaired immune responses in diabetes mellitus: analysis of the factors and mechanisms involved: relevance to the increased susceptibility of diabetic patients to specific infections. **Diabetes and Metabolism**, v. 18, p. 187-201, 1992.

MOWAT, A.G., BAUM, J. Chemotaxis of polymorfonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**, v. 284, p. 621-627, 1971.

NAZLIGUL Y, SABUNCU T, OZBILGE H. Is there a predisposition to intestinal parasitosis in diabetic patients? **Diabetes Care**, v. 24, p. 1503-1504,2001.

NEGISHI, K., GUPTA, S., CHANDY, K.G. Interferon responsiveness of natural killer cells in type I human diabetes. **Diabetes Research**, v. 7, p. 49-52, 1988.

- NEWTON, R.C., LIMPUANGTHIP, P., GREENBERG, S., GAM, A., NEVA, F.A. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in a carrier of HTLV-1 virus with evidence of selective immunosuppression. **American Journal of Medicine**, v. 92, p. 202-208, 1992.
- PAULA, F.M.; CASTRO, E.; GONÇALVES-PIRES, M.R.F.; MARÇAL, M.G.; 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. 51-55, 2000.
- PELLEGRINO, J., CHAIA, G., POMPEU MEMORIA, J.M. Observações sobre reação intradérmica com antígeno de *Strongyloides ratti* em pacientes com estrongiloidíase. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.3, p. 181-186, 1961.
- PIRES, M.L., DREYER, G. Revendo a importância do *Strongyloides stercoralis*. **Revista do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 48, n. 4, p. 175-182, 1993.
- POZZILLI, P., PAGANI, S., ARDUINI, P. In vivo determination of cell mediated immune response in diabetic patients using a multiple intradermal antigen dispenser. **Diabetes Research**, v. 6, p. 5-8, 1987.
- RICHIE, L.S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. **Bulletin of the National Service of Army- Medical Department**, v. 8, p. 326-334, 1948.
- RUGAI, E.; MATTOS, T.; BRISOLA, A.P. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes: modificações do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolph Lutz**, v. 14, p. 5-8, 1954
- SANTOS, M. A. Q.; PAÇÔ, J.M.; ISAC, E.; ALVES, E.L.; VIEIRA, M.A. Prevalência estimada de parasitas intestinais em escolares de creches e estabelecimentos de ensino em Goiânia- Goiás. **Revista de Patologia Tropical de Goiânia**, v. 19, p. 35-45, 1990
- SATO, Y.; INOUE, F.; MATSUYAMA, R.; SHIROMA, Y. Immunoblot analysis of antibodies in human strongyloidiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, p. 403-406, 1990.
- SATO, Y., TOMA, H. KIYUNA, S. SHIROMA, Y. Gelatin particule indirect agglutination test for examination for strongyloidiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 515-518, 1991.
- 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, p. 248-250, 1995.

SENTOCHNIK, D.E., ELIOPOULOS, G.M. Infection and Diabetes. In: **Joslin's Diabetes Mellitus**. 13 ed. Lea & Febiger. Malvern, 1994, 1068 p., p. 867-888.

SIDDIQUI AA, BERK SL. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. **Clinics of Infectious Diseases**, v. 33, p. 1040-1047, 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, p. 687-691, 2003.

SOERENSEN, B., CORREA, H.C.S., FREITAS, J.P.A. BANDEIRA, D.C. A estromboloidiase simulando tumores gastrointestinais ou associada à processos neoplásicos. Seu tratamento pelo thiabendazol. **Revista Brasileira de Cirurgia** v. 3, p. 159-165, 1964.

SUDARSHI, S.; STUMPFLE, R.; ARMSTRONG, M.; ELLMAN, T.; PARTON, S.; KRISHNAN, P.; CHIODINI, P.L.; WHITTY, C.J.M. Clinical presentation and diagnostic sensitivity of laboratory tests for *Strongyloides stercoralis* in travellers compared with immigrants in a non-endemic country. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, p. 728-732, 2003.

THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. **Diabetes care**, v.20, n.7, p.1183-1196, 1997.

TOWBIN, H., STAEHELIN, T., GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

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. 967-973, 1999.

VALERIUS, N.H., EFF, C., HANSEN, N.E. Neutrophil and lymphocyte function in patients with diabetes mellitus. **Acta Medica Scandinava**, v. 211, p.463-467, 1982.

van der FELTZ, M.; SLEE, P.H.T.J.; van HEES, P.A.M.; TERSMETTE, M. *Strongyloides stercoralis* infection: how to diagnose best? **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 55, p. 128-131, 1999.

VENTURI, M., VILIOTTI, W.M. Disseminated strongyloidiasis in a diabetic patient. **Revista Paulista de Medicina**, v. 102, n. 6, p. 283, 1984.

WONG, T.Y.H., SZETO, C.C., LAI, F.F.M., MAK, C.K., LI, P.K.T. Nephrotic syndrome in strongyloidiasis: Remission after eradication with anthelmintic agents. **Nephron**, v. 79, p. 333-336, 1998.