

## Strongiloidiasi nei bambini delle scuole elementari di Borbon, Ecuador: valutazione della prevalenza e della validità dei metodi diagnostici applicando la “latent class analysis”

JUAN MOREIRA<sup>1,3</sup>, MARIELLA ANSELMINI<sup>1,2</sup>, JEF VAN DEN ENDE<sup>3</sup> MARIA GOBBO<sup>2</sup>, JORGE ENDARA<sup>3</sup>,  
MONICA DEGANI<sup>2</sup>, ZENO BISOFFI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Epidemiología Comunitaria y Medicina Tropical, Esmeraldas - Ecuador.

<sup>2</sup>Centro per le Malattie Tropicali - Fondazione Don Calabria, Negar - Italia.

<sup>3</sup>Institute of Tropical Medicine, Antwerp - Belgium

<sup>4</sup>Area de Salud Borbón - Ministerio de Salud Pública, Borbón - Ecuador.

**Riassunto** - Per conoscere la prevalenza della strongiloidiasi nei bambini delle scuole elementari di Borbon (Esmeraldas, Ecuador) e l'accuratezza della microscopia diretta, del conteggio degli eosinofili e del dosaggio degli anticorpi per confermare e/o escludere un' infezione, sono stati esaminati 195 bambini.

A tutti è stato fatto un esame coproparassitologico (microscopia diretta e con metodo di concentrazione formalina - etere), un emocromo con formula e il dosaggio degli anticorpi anti-*Strongyloides* su siero. I dati sono stati analizzati con la Latent Class Analysis (LCA). La grandezza delle classi ottenute è stata del 68.9% e 31.0%, quest'ultima corrispondente alla plausibile prevalenza dello *Strongyloides stercoralis*. Un terzo dei bambini delle scuole elementari di Borbón risulta quindi infestato da *S. stercoralis*. Nessuno dei metodi diagnostici diretti è sufficientemente sensibile. In realtà simili si dovrebbe considerare la possibilità di includere l'ivermectina nei programmi di trattamento antiparassitario di massa.

*Strongyloidiasis in primary - school children of Borbon, Ecuador - evaluation of prevalence and diagnostic tests validity by “latent class analysis”*

**Summary** - In order to know the prevalence of strongyloidiasis in school children in Borbon (Esmeraldas, Ecuador) and the accuracy of direct and concentrated microscopic examination, of the eosinophil count and of a serologic assay to detect antibodies to confirm or exclude an infection, 195 children were examined. All were submitted to stool examination (both direct and after formol - ether concentration), eosinophils count and a serologic assay to detect antibodies for *Strongyloides*. A latent class analysis was (LCA) was carried out on laboratory results.

The clusters size were of 68.9% and 31.0%, being the latter the plausible prevalence of *Strongyloides stercoralis*. One third of the school children is therefore infected by *S. stercoralis*. None of the direct diagnostic methods has an acceptable sensitivity. In such circumstances, the extension of mass anti-elminthic treatments including the use of ivermectin should be considered.

**Keywords:** Ecuador, strongyloidiasis, latent class analysis, LCA

### INTRODUZIONE

*Strongyloides stercoralis* è l'agente eziologico di una geelmintiasi tipica delle aree tropicali e subtropicali. Si stima che circa 100 milioni di persone nel mondo ne siano infestate, anche se non si conosce la vera grandezza del problema (CONCHA *et al.*,

2005; KEISER, NUTMAN, 2004). A causa dell'eterogeneità dei vari contesti di popolazioni e dei test diagnostici utilizzati, gli studi di prevalenza realizzati in America Latina hanno evidenziato tassi molto variabili (DE PAULA *et al.*, 2000; de MUYNCK *et al.*, 1982). La variabilità è dovuta anche al ciclo vitale di *S. stercoralis* che permette un'autoinfesta-

zione interna costante con un'eliminazione intermittente di larve con le feci (CONCHA *et al.*, 2005; KEISER, NUTMAN, 2004), ma dipende anche dal fatto che non esiste un esame che possa essere considerato come un "golden standard" ideale e perciò risulta molto difficile valutare la sensibilità e specificità dei differenti esami, e quindi determinare la vera prevalenza in una popolazione (JOSEPH *et al.*, 1995). Negli ultimi anni la diagnosi di strongiloidiasi è migliorata grazie all'introduzione di tecniche sierologiche (IFAT, Elisa, Western Blot) che potrebbero avere un potere discriminante migliore (CONCHA *et al.*, 2005), ma finora il loro impiego è stato limitato ai laboratori di maggior complessità.

Nei soggetti immunocompetenti l'infestazione da *S. stercoralis* può essere asintomatica o può determinare manifestazioni cliniche gastrointestinali (talora con malassorbimento e calo ponderale), respiratorie e/o dermatologiche come prurito generalizzato, accompagnato o meno da eruzioni cutanee (CONCHA *et al.*, 2005), ma in condizioni di immunodepressione, specialmente dell'immunità cellulare, secondaria a malattie (infezione HIV o HTLV-1, linfomi) o iatrogena (trattamenti corticosteroidi, antiblastici o immunosoppressori), può riattivarsi e determinare una forma disseminata molto grave, quasi invariabilmente mortale (CONCHA *et al.*, 2005; KEISER, NUTMAN, 2004).

L'importanza della strongiloidiasi come problema di sanità pubblica è accentuata dall'inefficacia dei farmaci antiparassitari generalmente utilizzati per il trattamento antiparassitario individuale o di massa (CONCHA *et al.*, 2005; KEISER, NUTMAN, 2004). In aree simili a quella di studio inoltre vi è spesso un accesso irrazionale e indiscriminato ai farmaci (DAY *et al.*, 2005), ed è frequente ad esempio il ricorso ai corticosteroidi per il trattamento di patologie banali o di alcune malattie croniche (asma, artropatie, malattie cutanee). Un ulteriore problema è l'aumento progressivo della prevalenza dell'infezione da HIV in America Latina e in Ecuador, specialmente nelle zone più povere (HACKER *et al.*, 2005; CALLEJA *et al.*, 2002; BAUTISTA *et al.*, 2004) e l'esistenza di zone con una prevalenza considerevole di infezioni da HTLV-1 (12, 13). Tutto questo implica un rischio potenziale, non facilmente calcolabile, di sindromi da iperinfestazione o di strongiloidiasi disseminata (CONCHA *et al.*, 2005; KEISER, NUTMAN, 2004).

Prendendo in considerazione queste implicazioni, abbiamo voluto definire la prevalenza dell'infestazione nei bambini delle scuole elementari di Borbon, un paese rurale della provincia di Esmeraldas, nel nord dell'Ecuador, vicino a una zona dove da anni è attivo un programma di controllo dell'Oncocercosi con trattamento di massa con ivermectina (GUDERIAN JR *et al.*, 1997; GUDERIAN RH *et*

*al.* 1997).

Si è ritenuto opportuno inoltre valutare differenti tecniche diagnostiche, parassitologiche, sierologiche ed ematologiche al fine di conoscere il loro reale potere discriminativo sul terreno.

## MATERIALI E METODI

### L'area dello studio

Borbón è una comunità di 3600 abitanti, localizzata nel nord della provincia di Esmeraldas, latitudine 1° 96'S a 1° 43'N, longitudine 78° 48'W a 80° 9'W, sulla costa nord dell'Ecuador. Borbón è il centro commerciale e amministrativo di riferimento per 140 comunità dove vivono 25.000 persone, la maggior parte di origine africana, assieme a amerindi e meticci. Tanto Borbón come le comunità sul territorio sono localizzate sulle rive di tre grandi fiumi di cui il principale è il rio Santiago: la maggior parte delle comunità è raggiungibile solo via fluviale. Il clima della regione è caldo-umido, con un'altezza sul livello del mare variabile da 0 a 400 m. L'umidità oscilla tra 80 e 90% e le precipitazioni tra 3500 e 4500 mm all'anno. Il sistema sanitario locale è costituito da un ospedale con 20 posti letti a Borbón, 12 ambulatori sul territorio e una rete di 50 agenti sanitari di villaggio che realizzano attività curative, preventive, educative. In alcune comunità, eccetto Borbon, c'è trasmissione di oncocercosi e dal 1991 è attivo il programma di controllo con distribuzione massiva semestrale di ivermectina (GUDERIAN JR *et al.*, 1997; GUDERIAN RH *et al.* 1997).

### La metodologia

La ricerca è stata inserita nel programma nazionale di controllo della salute del bambino per l'ammissione al nuovo anno scolastico che realizza ogni anno il sistema sanitario locale. Il programma prevede un esame clinico completo con test di laboratorio (coproparassitologico, emocromo con formula) a tutti i bambini delle scuole elementari.

Per ogni bambino presentatosi al controllo si è raccolto, previo consenso informato di uno dei genitori, un campione di sangue venoso per l'emocromo con formula e per la sierologia ed un campione di feci in formalina al 10% per l'esame coproparassitologico diretto e concentrato con tecnica formalina-etere sec. Ritchie (16). Il microscopico diretto e l'emocromo con formula sono stati eseguiti nel laboratorio dell'ospedale di Borbon; l'esame delle feci concentrato e la sierologia per *S. stercoralis* sono stati eseguiti nel laboratorio del Centro per le Malattie Tropicali dell'ospedale "Sacro Cuore" di Negrar (Verona).

Sia per l'esame diretto delle feci che per il concentrato sono stati esaminati 100 ml di feci con obiettivo 10x. Per la sierologia, il campione di siero è stato congelato a -20° Celsius in tubi di Eppendorf per la

successiva realizzazione dell'immunofluorescenza IFAT e il dosaggio anticorpale, utilizzando larve L3, tecnica descritta dettagliatamente in una precedente pubblicazione (GOBBO, 1998).

#### Considerazioni etiche

Dopo un incontro nella scuola con i genitori dei bambini durante il quale sono stati presentati gli obiettivi dello studio, è stato ottenuto il consenso a procedere. La partecipazione è stata volontaria e ogni bambino è stato esaminato alla presenza di uno dei due genitori. Ogni famiglia ha ricevuto il risultato degli esami e tutti i bambini positivi per qualche parassita sono stati trattati con albendazolo e/o metronidazolo, senza peraltro valutare la risposta al trattamento.

#### Analisi dei dati

Per superare l'ostacolo metodologico dell'assenza di un "golden standard" che permetta un'analisi adeguata della prevalenza, si è optato per la tecnica statistica detta "Latent Class Analysis" (LCA) (LAZARFELD, HENRY, 1968), un metodo sviluppato negli anni 60 la cui finalità è identificare sotto-gruppi ("classi") di casi relazionati a partire da combinazioni di dati categorici. Può essere usata per classificare soggetti in 2 o più classi (es.: pazienti con o senza la malattia), basandosi sulle possibili combinazioni delle caratteristiche osservate (es.: sintomi, segni, dati di laboratorio), denominate "variabili manifeste". Attraverso un computo iterativo, LCA costruisce vari modelli plausibili per risolvere il problema della classificazione (in questo caso: "come classificare i soggetti dello studio in due gruppi: con *Strongyloides* e senza *Strongyloides*"). Successivamente si usano i dati osservati per stimare i differenti parametri che corrispondono ai modelli costruiti. Questi parametri sono: la prevalenza di ogni classe latente e la sensibilità e specificità di ogni caratteristica, considerando che una "classe malattia" - nel nostro caso la "classe *Strongyloides*" - è stata identificata grazie a una variabile manifesta, assunta a priori come un buon predittore di questa malattia. Si usano alcune prove statistiche per valutare qual è il modello più plausibile e in questo modo scegliere quale si avvicina di più alla realtà. Una spiegazione più dettagliata e chiara di questo metodo, si può trovare in: <http://ourworld.compuserve.com/homepages/jsuebersax/index.htm>.

**Tabella I - Confronto dei modelli della LCA**

	Numero di classi	Coefficiente L <sup>2</sup>	Gradi di libertà	valore-p
Modello 1	2	10.083	6	0.12
Modello 2	3	6.489	1	0.011
Modello 3	3	13.726	14	0.47
Modello 4 *	2	17.283	20	0.64

\*Modello scelto per l'analisi.

Si sono valutati vari modelli con 2 classi, combinando i risultati dell'esame microscopico (diretto e concentrato), il conteggio degli eosinofili, il dosaggio degli anticorpi e la presenza o meno di altra infestazione parassitaria. Basandosi sul modello scelto si è ottenuta la migliore approssimazione della prevalenza della "classe *Strongyloides*" così come la sensibilità e la specificità di ognuna delle caratteristiche introdotte nella combinazione. Per l'analisi sono stati utilizzati i software Latent Gold® (V 2.0.18, Statistical Innovations, Belmont, MA, USA) e EPIINFO (V 6.04b, Centres for Disease Control & Prevention, Atlanta, USA).

#### RISULTATI

Sono stati esaminati 195 bambini di età compresa tra i 5 e i 14 anni con una media di 8.2 anni (St. Dev=1.96). Novantaquattro (48%) erano maschi e 101 (52%) femmine.

In 179 bambini (91.8%) era presente almeno uno dei seguenti elminti al coproparassitologico (diretto e concentrato): *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichuria*, *Ancylostoma duodenalis*, *Strongyloides stercoralis*, *Enterobius vermicularis*. Fra tutti, *Trichuris trichuria* è stato il più frequentemente diagnosticato, presente in 167 bambini (86%). *Strongyloides stercoralis* era presente in 11 bambini (6%) al microscopico diretto e in 47 (24%) dopo arricchimento.

Tra i modelli LCA valutati, quello che ha raggiunto un maggior grado di concordanza (Tabella I) ha combinato i risultati dell'esame microscopico diretto e concentrato, un numero assoluto di eosinofili  $\geq 1000/\mu l$  e un titolo anticorpale anti *Strongyloides* 1:160. Le dimensioni delle classi ottenute sono state

**Tabella II - Sensibilità e specificità delle caratteristiche combinate**

	Sensibilità	Specificità
	%	%
Esame microscopico diretto	3,2	93,2
Esame microscopico arricchito	49,2	87,9
Numero assoluto degli eosinofili $\geq 1000/\mu l$	68,7	71,4
Dosaggio degli anticorpi $\geq 1:160$	74,1	98,4

68.9% e 31.0%, quest'ultima con la proporzione più alta di soggetti con positività degli anticorpi, per cui questo valore corrisponde alla miglior stima di prevalenza dello *Strongyloides*. Le sensibilità e specificità delle differenti caratteristiche sono elencate nella Tabella II.

## DISCUSSIONE

Nei villaggi del distretto sanitario di Borbon non endemici per Oncocercosi e quindi non sottoposti a trattamento massivo con ivermectina, almeno un terzo dei ragazzi in età scolare potrebbe essere infettato dallo *Strongyloides stercoralis*. Come prevedibile, nessuno dei metodi diagnostici utilizzati, da solo, ha un sufficiente potere discriminante nell'identificare correttamente i soggetti da sottoporre a trattamento. Nonostante che la sierologia a una diluizione maggiore o uguale a 1:160 presenti la migliore combinazione di sensibilità e specificità, il suo utilizzo non è praticabile nella maggior parte delle zone rurali dei paesi tropicali, ed è stata usata nel nostro lavoro solo per ottenere una stima corretta della prevalenza dell'infestazione.

L'importanza della strongiloidiasi come problema di salute pubblica dipende dal rischio potenziale di sviluppare forme gravi. Con una prevalenza così elevata dell'infestazione in un'area di frequente infezione HTLV-1 (HACKER *et al.*, (2005); CALLEJA *et al.*, 2002; BAUTISTA *et al.*, 2004; GOTUZZO *et al.*, 2000; GUDERIAN *et al.*, 1994), e in una situazione di frequente uso irrazionale di farmaci (DAY, 2005), sarebbe auspicabile poter contare con una metodica di laboratorio che permetta di escludere l'infestazione, in modo che le persone sospette possano beneficiare di un trattamento efficace, ma purtroppo i metodi microscopici diretti hanno una bassa sensibilità.

Non si conosce con esattezza il rischio di strongiloidiasi disseminata secondaria a trattamenti e/o malattie che causano immunosoppressione; neppure disponiamo di dati sulla frequenza dell'uso di farmaci che possono causarla. Inoltre la morte per strongiloidiasi disseminata può presentare uno spettro di sintomi molto ampio, e probabilmente la maggior parte dei casi non viene diagnosticata, rendendo ancora più difficile la stima dell'incidenza di questa complicanza. Ad ogni modo il rischio è concreto e l'evento finale così grave da giustificare, secondo noi, un intervento a livello di popolazione in zone con una prevalenza così alta.

In Ecuador è operativo un programma di trattamento antiparassitario di massa nelle scuole con albendazolo, ma l'intervento non è mai stato molto sistematico e il farmaco viene somministrato a un dosaggio insufficiente per il trattamento della strongiloidiasi (CONCHA *et al.*, 2005; KEISER, NUTMAN,

2004), peraltro la sua efficacia è comunque limitata. Considerando che almeno uno studente su tre a Borbón è verosimilmente infestato da *S. stercoralis*, sarebbe opportuno integrare i programmi di trattamento di massa con farmaci più efficaci, in particolare l'ivermectina, (CONCHA *et al.*, 2005; KEISER, NUTMAN, 2004) fra l'altro ben tollerata, considerando anche che nei villaggi vicini questo tipo di intervento è già effettuato periodicamente per il controllo dell'oncocercosi. Abbiamo osservato, peraltro, che nelle aree di oncocercosi, dove la popolazione è trattata periodicamente con ivermectina, la prevalenza della strongiloidiasi è virtualmente zero (dati non pubblicati).

Per poter dare più forza a queste raccomandazioni sarebbe utile studiare meglio il rischio di strongiloidiasi disseminata nella popolazione per poter fare un'analisi costo/beneficio di un intervento sistematico.

In conclusione, la strongiloidiasi costituisce un problema di salute molto frequente per i bambini di Borbón, e probabilmente per tutta la popolazione; si conferma la bassa sensibilità degli esami di laboratorio disponibili nella maggior parte dei paesi; sarebbe utile/necessario iniziare un programma di trattamento di massa con farmaci efficaci (ivermectina) per prevenire complicanze gravi in aree con elevata prevalenza dell'infestazione.

## BIBLIOGRAFIA

- BAUTISTA CT, SANCHEZ JL, MONTANO SM, LAGUNA-TORRES VA, LAMA JR, SANCHEZ JL *et al.* (2004). Seroprevalence of and risk factors for HIV-1 infection among South American men who have sex with men. *Sex Transm.Infect.*, 80(6): 498-504.
- CALLEJA JM, WALKER N, CUCHI P, LAZZARI S, GHYS PD, ZACARIAS F. (2002). Status of the HIV/AIDS epidemic and methods to monitor it in the Latin America and Caribbean region. *Aids*, 16 Suppl 3: S3-12.
- CONCHA R, HARRINGTON W, JR., ROGERS AI. (2005). Intestinal strongyloidiasis: recognition, management, and determinants of outcome. *J Clin.Gastroenterol.*, 39(3): 203-11.
- COOPER PJ, GUEVARA A, GUDERIAN RH. (1993). Intestinal helminthiasis in Ecuador: the relationship between prevalence, genetic, and socioeconomic factors. *Rev Soc Bras Med Trop*, 26(3): 175-80.
- DAY RO, BIRKETT DJ, MINERS J, SHENFIELD GM, HENRY DA, SEALE JP. (2005). Access to medicines and high-quality therapeutics: global responsibilities for clinical pharmacology. A major theme of the 2004 World Congress of Clinical Pharmacology and Therapeutics was worldwide

- equity of access to medicines. *Med.J Aust.*, 182(7): 322-3.
- de MUYNCK A, ZUNA H, SILVA DL, RIBERA B. (1982). Clinico-epidemiological study of strongyloidiasis in pregnant women in Santa Cruz, Bolivia. *Bol.Chil.Parasitol.*, 37(3-4): 50-4.
- DE PAULA FM, DE CASTRO E, GONCALVES-PIRES M, MARCAL M, CAMPOS DM, COSTA-CRUZ JM. (2000). Parasitological and immunological diagnoses of strongyloidiasis in immunocompromised and non-immunocompromised children at Uberlandia, State of Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst.Med.Trop.Sao Paulo*, 42(1): 51-5.
- GOBBO M, CARRARA A, DEGANI M, MISTRETTA M, BISOFFI Z. Evaluation of a serologic test (IF) for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. Atti 2° Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina Tropicale. Bardolino: 1998.
- GOTUZZO E, ARANGO C, QUEIROZ-CAMPOS A, ISTURIZ RE. (2000). Human T-cell lymphotropic virus-I in Latin America. *Infect.Dis Clin.North Am*, 14(1): 211-xi.
- GUDERIAN JR, ANSELMI M, ESPINEL M, SANDOVAL C, COOPER PJ, RIVADENEIRA G et al. Onchocerciasis in Ecuador: prevalence of infection on the Ecuador-Colombia border in the Province of Esmeraldas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997;92(2):157-62.
- GUDERIAN R, GUEVARA A, COOPER P, RUGELES MT, ARANGO C. (1994). HTLV-1 infection and tropical spastic paraparesis in Esmeraldas Province of Ecuador. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 88(4): 399-400.
- GUDERIAN RH, ANSELMI M, ESPINEL M, MANCERO T, RIVADENEIRA G, PROANO R et al. Successful control of onchocerciasis with community-based ivermectin distribution in the Rio Santiago focus in Ecuador. *Trop Med Int Health* 1997;2(10):982-8.
- HACKER MA, MALTA M, ENRIQUEZ M, BASTOS FI. (2005). Human immunodeficiency virus, AIDS, and drug consumption in South America and the Caribbean: epidemiological evidence and initiatives to curb the epidemic. *Rev Panam Salud Publica*, 18(4-5): 303-13.
- JOSEPH L, GYORKOS TW, COUPAL L. (1995). Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. *Am J Epidemiol*, 141(3): 263-72.
- KEISER PB, NUTMAN TB. (2004). *Strongyloides stercoralis* in the Immunocompromised Population. *Clin.Microbiol.Rev*, 17(1): 208-17.
- KOBAYASHI J, HASEGAWA H, SOARES EC, TOMA H, DACAL AR, BRITO MC et al. (1996). Studies on prevalence of *Strongyloides* infection in Holambra and Maceio, Brazil, by the agar plate faecal culture method. *Rev Inst.Med.Trop.Sao Paulo*, 38(4): 279-84.
- LAZARSEFELD PF, HENRY NW. *Latent Structure Analysis*. Boston: Houghton Mifflin.; 1968.
- LYNNE S, GARCIA L, BRUCKNER DA. *Diagnostic Medical Parasitology*. 3ed. 1997.