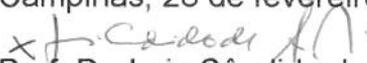


CÉLIA REGINA MENDES

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas da aluna **Célia Regina Mendes**.

Campinas, 28 de fevereiro de 2002.


Prof. Dr. Luiz Cândido de Souza Dias
Orientador

***ESTUDO COMPARATIVO DE TÉCNICAS
PARASITOLÓGICAS E IMUNOLÓGICA NO DIAGNÓSTICO
DE PARASITOS INTESTINAIS.***

CAMPINAS

2002

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

CÉLIA REGINA MENDES

***ESTUDO COMPARATIVO DE TÉCNICAS
PARASITOLÓGICAS E IMUNOLÓGICA NO DIAGNÓSTICO
DE PARASITOS INTESTINAIS.***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre
em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ CANDIDO DE SOUZA DIAS

CAMPINAS

2002

UNIDADE Be
Nº CHAMADA T/UNICAMP
M522e
V _____ EX _____
TOMBO BCI 49685
PROC 16-837-102
C _____ DV _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 15/06/02
Nº CPD _____

CM00169241-9

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

BIB ID 243555

~~M5236~~

M522e

Mendes, Célia Regina

Estudo comparativo de técnicas parasitológicas e imunológica no diagnóstico de parasitos intestinais. / Célia Regina Mendes. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Luiz Candido de Souza Dias
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Amebíase. 2. ELISA. I. Luiz Candido de Souza Dias. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

UNICAMP

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cândido de Souza Dias

Membros:

1. Prof. Dr. Oswaldo Marçal Júnior

2. Profa. Dra. Célia Regina Galipp

3. Prof. Dr. Luiz Cândido de Souza Dias

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/02/2002

2002-06711

DEDICATÓRIA

*Aos meus Pais e meus irmãos que me ensinaram a viver
com honestidade e dignidade sempre incentivadores e
confiantes em mim.*

A Deus, que ilumina os caminhos para que eu atinja meu ideal

Ao Prof. Dr. Luis Candido de Souza Dias pela valiosa orientação, compreensão e paciência nos momentos mais difíceis e por estar presente em mais um grande passo da minha caminhada.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Correa – Departamento de Medicina Preventiva e Social da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP – pela amizade, dedicação e colaboração na execução deste trabalho.

A Dra. Vera Lucia P. Castilho – Divisão de Laboratório Central - Hospital de Clínicas – Faculdade de Medicina , USP – pelo fornecimento das amostras para realização deste trabalho.

À Angela Terezinha Lauand S. Teixeira – Laboratório de Patologia Clínica, seção de Parasitologia Clínica, Hospital de Clínicas da UNICAMP – pela amizade, incentivo constante e valiosas sugestões durante a realização deste trabalho.

À Rosana Aparecida Trevisan – Laboratório de Parasitologia, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, UNICAMP – pela amizade, dedicação e valiosa ajuda na realização dos exames.

Ao José Henrique Marques Schiavo pela amizade, dedicação e paciência principalmente nos ensinamentos quanto aos programas de computação.

À Juliana Julien Salvarani pela amizade e estímulo nas horas mais desanimadoras.

A Diretoria de Apoio Didático Científico e Computacional – Áudio Visual e Laboratório de Informática pelos serviços prestados.

Ao Edward José de Oliveira pela colaboração no transporte das amostras.

Ao Jorge e Alexandre, funcionários do Setor de Informática do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, UNICAMP – pela amizade, paciência e auxílio no uso de programas de computação.

Aos funcionários da Seção de Parasitologia pela amizade, compreensão e auxílio na realização dos exames:

José Sérgio Rodrigues Palma – Seção de Parasitologia Clínica, Laboratório de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas, UNICAMP.

Marisa de Andrade - Seção de Parasitologia Clínica, Laboratório de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas, UNICAMP.

Sueli Aparecida de Oliveira - Seção de Parasitologia Clínica, Laboratório de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas, UNICAMP.

Tacilda S. Nalon - Seção de Parasitologia Clínica, Laboratório de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas, UNICAMP.

À Silvia Panebianco e Marlúcia F. Façanha pelas orientações e ajuda necessárias.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

A todos os que direta e indiretamente me ajudaram no auxílio deste trabalho.

O meu muito obrigada!

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>xiv</i>
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
Amostragem.....	31
Técnicas Parasitológicas.....	31
Técnica de Kato-Katz.....	31
Técnica de Coprotest.....	34
Técnica de Lutz.....	36
Técnica de hematoxilina férrica.....	36
Morfometria.....	39
Técnica Imunológica.....	40
Análise Estatística.....	43
4. RESULTADOS	44
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÕES	68
7. SUMMARY	70

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
9. ANEXOS.....	81
Anexo 1.....	
Anexo 2.....	

LISTA DE ABREVIATURAS

APV	Ácool Polivinílico
ADN	Ácido Desoxirribonucléico
ARN	Ácido Ribonucléico
AEEH	Antígeno Específico de <i>Entamoeba histolytica</i> / <i>Entamoeba dispar</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
MIF	Mertiolato-Iodo-Formaldeido
NCP	Níveis de carga parasitária
OPG	Ovos por grama de fezes
PCR	Polymerase Chain Reaction
SAF	Acetato de Sódio-Ácido Acético-Formaldeído
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
USP	Universidade de São Paulo

	PÁG.
TABELA 1: Freqüência de helmintos intestinais em indivíduos do município de Pedro de Toledo, SP, pelos métodos de Coprotest® e Kato-Katz.....	46
TABELA 2: Freqüência de protozoários intestinais em 364 indivíduos do município de Pedro de Toledo, pelo método de Coprotest®.....	47
TABELA 3: Comparação dos métodos de Coprotest® e Kato-Katz em fezes de 332 indivíduos do município de Pedro de Toledo – SP.....	48
TABELA 4: Avaliação do método de Coprotest® em relação ao método de Kato Katz (padrão) para helmintos intestinais em 332 amostras de fezes de indivíduos, do município de Pedro de Toledo, SP.....	49
TABELA 5: Comparação entre amostras positivas e negativas do método de Coprotest® quanto ao número de ovos por grama de fezes detectado pelo método de Kato Katz.....	50
TABELA 6: Intensidade de infecção de helmintos, segundo método de Kato-Katz, em amostras de fezes de indivíduos do município de Pedro de Toledo – SP.....	52
TABELA 7: Freqüência de parasitos intestinais pelos métodos de Coprotest®, hematoxilina férrica, Lutz e ELISA para <i>Entamoeba histolytica/E.dispar</i> em 86 amostras de fezes de pacientes dos Hospitais de Clínicas, da UNICAMP e da USP (SP).....	53

TABELA 8:	Avaliação dos métodos de Coprotest® e Lutz usando a hematoxilina férrica como padrão para protozoários intestinais em 86 amostras de fezes de pacientes dos Hospitais de Clínicas, da UNICAMP e da USP (SP).....	54
TABELA 9:	Avaliação dos métodos de Coprotest®, Lutz e ELISA para <i>Entamoeba histolytica/E.dispar</i> usando a hematoxilina férrica como padrão, em 86 amostras de fezes de pacientes dos Hospitais de Clínicas, da UNICAMP e da USP (SP).....	55

	<i>PÁG.</i>
FIGURA 1: Esquema do processamento de amostras pelo método de Kato-Katz.....	33
FIGURA 2: Esquema do processamento das fezes através do Método de Coprotest®.....	35
FIGURA 3: Esquema do processamento de amostras pelo método de Lutz.....	37
FIGURA 4: Esquema do processamento de amostras pelo método de hematoxilina férrica.....	38
FIGURA 5: Esquema do processamento das amostras pelo método imunoenzimático para detecção de antígenos nas fezes.....	42

	<i>PÁG.</i>
QUADRO 1: Classificação da intensidade de infecção, segundo número de ovos por grama de fezes (WHO, 1993; Rey, 1991 e Pessoa, 1982).....	32



RESUMO

O diagnóstico parasitológico deve ser realizado de maneira apropriada, com maior sensibilidade e especificidade para a detecção dos parasitos intestinais, uma vez que dele dependerá o tratamento específico. Foi desenvolvido um estudo comparativo para avaliar a concordância entre os métodos Kato-Katz e Coprotest® na detecção de helmintos em 332 indivíduos do município de Pedro de Toledo e entre os métodos de Coprotest®, Lutz, hematoxilina férrica e ELISA (antígenos nas fezes) para diagnóstico de protozoários em 86 pacientes com história de amebíase intestinal. Na comparação de Kato-Katz com Coprotest®, observou-se uma diferença significativa para *Trichuris trichiura* que foi de 16,2% no Kato-Katz e de 7,5% no Coprotest®. Devido a essa diferença comparou-se amostras positivas e negativas do método de Coprotest® com número de ovos por grama de fezes (opg) obtido pelo método de Kato-Katz. Quando o método de Coprotest® foi negativo, contou-se 65 opg pelo Kato-Katz e quando o Coprotest® foi positivo, esse número foi maior, 199 opg. O Coprotest® mostrou-se inferior ao Kato-Katz quando a intensidade de infecção foi baixa. Não houve diferença significativa para *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* entre os métodos Lutz, Coprotest®, hematoxilina férrica e ELISA, indicando ótima concordância entre os mesmos.



1. INTRODUÇÃO

Doenças parasitárias são causas importantes de morbidade e mortalidade em muitas partes do mundo e são especialmente problemáticas quando ocorrem em indivíduos debilitados.

Com o crescimento populacional nos países tropicais e o aumento da densidade demográfica, sem a melhoria das condições gerais de vida, houve um acréscimo na transmissão das infecções parasitárias. Com o advento da AIDS, as infecções parasitárias passaram a representar grave problema para esses pacientes, já que não são raras e podem ser fatais. Com o aumento do número desses pacientes, torna-se importante a necessidade de se realizar o diagnóstico parasitológico com maior sensibilidade e especificidade. Assim, o diagnóstico deve ser mais exato e preciso na detecção dos parasitos intestinais (PETRI , CLARK JR., DIAMOND, 1994).

Entre as parasitoses intestinais, estimativas apontam que a amebíase atinja cerca de 10% da população mundial com morbidade anual entre 40.000 e 110.000 pessoas; a giardíase em torno de 200 milhões de pessoas. Cerca de um bilhão de indivíduos apresentam ascaridíase que é responsável por 1.550 óbitos anuais; os ancilostomatídeos parasitam aproximadamente 900 milhões de pessoas; tricuriíase de 500 a 800 milhões. As esquistossomoses em suas formas intestinais e urinária, atingem mais de 200 milhões de habitantes, com cerca de 500.000 a 1 milhão de óbitos anuais no mundo todo (GARCIA, 2001).

A prevalência de helmintíases intestinais é alta, principalmente na população infantil que vive em condições ambientais insalubres. Embora os seus portadores, na maioria das vezes, não apresentem sintomas, várias síndromes clínicas podem estar associadas à presença dos helmintos (ALBONICO *et al.* 1995). São freqüentes manifestações cutâneas, articulares, pulmonares, do sistema nervoso central e do tubo digestivo. Dentre os sintomas gastrointestinais, podemos ter diarréia como consequência da infecção por *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis*; dor abdominal nas infecções por *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, ancilostomatídeos e teníase; anemia secundária à perda sanguínea pelo tubo digestivo, pode estar associada à infecção por ancilostomatídeos e por *Trichuris trichiura* (MACHADO *et al.* 1996; MAIPANICH *et al.* 1997).

Os protozoários do tubo digestivo são encontrados em todo o mundo. Calcula-se que 5 a 50% da população mundial tenham *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* na luz intestinal. Cerca de 10% exibem sintomas clínicos que vão desde os não específicos de doença gastrointestinal até disenteria, colite e ameboma. Existem duas espécies de *Entamoeba* distintas em patogenicidade, mas morfologicamente idênticas que infectam o homem (BRUCKNER, 1992). *Entamoeba dispar* está associada com o portador assintomático e é predominante. *Entamoeba histolytica* é a forma patogênica causando diarreia aguda com presença de muco e sangue nas fezes (WALSH, 1986). A maioria das infecções por *Giardia intestinalis* é assintomática, e no Brasil seu índice de prevalência é de cerca de 28,5%, podendo variar de 11,3% no Estado do Rio de Janeiro a 51,8% no Estado do Rio Grande do Sul (GUIMARÃES & SOGAYAR, 1995). *Cryptosporidium parvum* é um agente oportunista causador de diarreia em pacientes com HIV, tendo sido detectado nos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, em 18,2% e 13%, respectivamente (COSTA CRUZ, FERREIRA, ROSSIN, 1996). A maior parte dos portadores de *Blastocystis hominis* não apresentam sintomas específicos e relatam dor abdominal, flatulência, náuseas e vômitos. Sua prevalência pode variar em torno de 2,94% no Estado de São Paulo (PIRES DE MATOS *et al.* 1998).

A maioria dos helmintos e protozoários que infectam o tubo digestivo do homem pode ser diagnosticada pelo encontro de seus ovos, larvas, cistos e oocistos nas fezes de pessoas infectadas. As técnicas utilizadas para diagnóstico estão baseadas na detecção daqueles elementos parasitários, após concentração, a partir do material fecal. Do ponto de vista prático, fatores como volume do material examinado, número de amostras coletadas em dias alternados, número de ovos e cistos produzidos pelos parasitos podem influenciar no diagnóstico (MARTIN & BEAVER, 1968; HALL, 1982).

É importante que o patologista clínico esteja alerta para aquelas parasitoses e saiba realizar apropriadamente as técnicas laboratoriais para o diagnóstico etiológico. Ressalta-se que a conduta terapêutica será preconizada de acordo com a espécie do parasito identificado.

A escolha de determinada técnica é baseada nas características físicas, mecânicas e biológicas dos estágios parasitários encontrados no organismo do hospedeiro (GARCIA, 2001). A maioria dos parasitos intestinais é detectada por meio de técnicas parasitológicas de concentração, como por exemplo, sedimentação por centrifugação, sedimentação espontânea e flutuação, entre outras (DE CARLI, 2001). Em virtude das baixas cargas parasitárias em nossos pacientes, o diagnóstico será mais preciso, quando se realiza a coleta de três amostras em dias alternados, num período de dez dias (CARTRIGHT, 1999).

O exame de uma única amostra de fezes muitas vezes não leva a um diagnóstico definitivo, uma vez que o número de formas parasitárias liberadas diariamente varia muito nos portadores. Sabendo-se que um portador pode eliminar 100.000 cistos por dia, a probabilidade de diagnóstico será de apenas 50%, quando uma única amostra é examinada. No entanto, quando se examinam três amostras coletadas em dias alternados, num período de dez dias, essa probabilidade aumenta para 82%, mesmo que o número de cistos eliminados seja cerca de 1% do valor anterior (1.000 cistos) (FERREIRA & ÁVILLA, 2001).

Em um laboratório de rotina é importante, além da coleta de 3 amostras de fezes, a realização de mais de um método parasitológico. Um desses métodos deve ser o de concentração para detectar cistos e oocistos de protozoários e ovos e larvas de helmintos, principalmente quando há uma baixa carga parasitária. Um outro seria específico para a suspeita clínica, como por exemplo, o método de Rugai quando há suspeita de estrogiloidíase e Willis para ancilostomíase.

Entre os métodos de concentração, destacam-se: Lutz, Coprotest® e Kato-Katz.

O método de Lutz (LUTZ, 1919), também conhecido como método de Hoffman, Pons & Janer (HOFFMAN, PONS, JANER, 1934), baseia-se na sedimentação espontânea por gravidade e é indicado para pesquisa de ovos e larvas de helmintos e cistos e oocistos de protozoários. Os ovos operculados e de esquistossoma são mais facilmente recuperados. O uso de grande quantidade de material fecal (mais ou menos 10g) nesse processo, em contraste com as pequenas quantidades usadas em outras técnicas, favorece

um diagnóstico satisfatório e seguro, mesmo quando o número de organismos presentes é pequeno. A grande vantagem da técnica de sedimentação é a necessidade mínima de vidraria, sendo dispensável o uso de reagentes e da centrifugação mecânica (DE CARLI, 2001).

O método de Coprotest® (CERQUEIRA, 1988), recentemente lançado no mercado, é uma modificação do método de Ritchie (RITCHIE, 1948), que consiste na associação das técnicas de centrifugação e sedimentação, permitindo o encontro de ovos e larvas de helmintos e cistos e oocistos de protozoários. Esse método preconiza a coleta de 1,4 gramas de fezes, conservadas em formalina tamponada para posterior processamento em acetato de etila, por meio de centrifugação (CERQUEIRA, 1988). Essa metodologia vem sendo utilizada no trabalho de rotina de vários laboratórios de hospitais públicos e privados com resultados promissores como método qualitativo (DIAS *et al.* 1997). Alguns autores compararam os resultados obtidos por meio dessa técnica com os métodos de Kato-Katz, Lutz, Faust e Rugai e encontraram boa concordância (MELLO *et al.* 1989; AMATO NETO *et al.* 1989; MANGINI *et al.* 1999). O kit vem provido de um dispositivo que permite a coleta de volume padronizado de fezes, cerca de um centímetro cúbico (1,4g), o que possibilita sua utilização no diagnóstico “quantitativo” de ovos nas fezes (ARAÚJO, 2000). Mostrou-se que o “Coprotest quantitativo”, quando aplicado em estudo populacional com intensidades de infecção média e alta, apresentou resultados comparáveis ao método de Kato-Katz, permitindo classificar a carga parasitária de casos de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *Schistosoma mansoni* (ARAÚJO, 2000). O “Coprotest quantitativo”, além de ter possibilitado a contagem de ovos de helmintos, permitiu diagnosticar a frequência de outras espécies parasitas, dificilmente diagnosticáveis por meio do método de Kato-Katz, como *Strongyloides stercoralis*, *Blastocystis hominis*, *Giardia intestinalis* e outros protozoários. Essa característica de possibilitar a detecção de diferentes elementos parasitários nas fezes, concomitante à quantificação de ovos, permite sugerir a aplicação do “Coprotest quantitativo” em estudos epidemiológicos, tanto para a determinação da prevalência de parasitoses diagnosticáveis por meio das fezes, como para a estimativa de intensidade das infecções por helmintos (ARAÚJO, 2000).

Kato-Katz é um método quali-quantitativo, muito usado para o diagnóstico de helmintos. Alguns helmintos como *Schistosoma mansoni*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e ancilostomatídeos podem ter sua carga parasitária avaliada (KATZ, CHAVES, PELLEGRINO, 1972). Baseia-se na concentração por tamização e na clarificação da amostra fecal por uma mistura de verde de malaquita a 3%, glicerina e água. O número médio de ovos encontrados nos esfregaços fecais, multiplicado por 24, corresponde ao número de ovos por grama de fezes. Por ser de fácil execução, baixo custo e boa sensibilidade, tem sido o mais utilizado, mostrando-se bastante útil na contagem de ovos dos geohelmintos. O método de Kato-Katz se impõe em inquéritos de campo pela possibilidade de conservação dos ovos por longos períodos e por permitir uma noção aproximada da intensidade da infecção no indivíduo e na população (COURA & CONCEIÇÃO, 1974).

Entre as várias espécies de helmintos que atingem o homem, destacam-se entre nós, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, ancilostomatídeos, *Strongyloides stercoralis* e *Schistosoma mansoni*.

Ascaris lumbricoides é vulgarmente conhecido como lombriga. O homem é capaz de infectar-se ao ingerir água ou vegetais crus poluídos com ovos contendo a forma larvária infectante. As crianças, freqüentemente mais infectadas que os adultos, podem também contaminar as mãos no solo poluído, levando, desta maneira, os ovos à boca por meio dos dedos ou ainda pelo hábito da geofagia, freqüente nas de menor idade. O diagnóstico da infecção é feito por meio da pesquisa de ovos nas fezes. Os métodos mais utilizados são o de sedimentação espontânea (método de Lutz), Coprotest® e o método Kato-Katz (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999).

Trichuris trichiura é um verme cosmopolita e muitas vezes acompanha o parasitismo por *Ascaris*, devido à resistência dos mesmos ao meio ambiente e modo de transmissão. As crianças são as que apresentam maior prevalência dessa verminose e o peridomicílio é o principal local de transmissão. No Brasil, a prevalência é de 51% em crianças. As taxas encontradas nas diversas regiões são distintas, sendo de 37,3% em São Paulo (MOURA & SOUZA JUNIOR, 1995). O diagnóstico é feito pelo exame de fezes,

pelos métodos de sedimentação espontânea (método de Lutz), Coprotest® ou pelo método de Kato-Katz (NEVES, *et al.* 2001).

Ancilostomíase designa a doença causada no homem pela ação de *Ancylostoma duodenale* ou de *Necator americanus* ou ainda, por uma associação dos dois helmintos. A infecção é muitas vezes assintomática. Entretanto, o desenvolvimento freqüente de anemia em pacientes sujeitos a infestações intensas, especialmente quando há também certo grau de deficiência alimentar, faz dessa verminose um dos mais sérios problemas médicos e sanitários (NEVES *et al.* 2001). No Brasil, em particular, predomina *Necator americanus*. Todavia, *Ancylostoma duodenale* é encontrado em 20% a 30% dos indivíduos infectados (CHAN, 1997). O diagnóstico é feito pelos exames de fezes, por método qualitativo, que indica ou não presença de ovos de ancilostomatídeos. Os métodos mais usados são os de sedimentação espontânea (métodos de Lutz), de sedimentação por centrifugação e de flutuação (Willis). Para se avaliar a intensidade de infecção do paciente, usa-se o método quali-quantitativo de Kato-Katz, cujo resultado expressa o número de ovos do parasita por grama de fezes (NEVES *et al.* 2001).

Strongyloides stercoralis é um helminto que infecta cerca de cem milhões de seres humanos ao redor do mundo. Ele causa infecção crônica, na maior parte das vezes, assintomática ou oligossintomática e a aquisição deste parasito se faz com a penetração das larvas filarióides pela pele ou mucosas. Uma particularidade de seu ciclo é a auto-infecção interna, que permite a este nematódeo sobreviver durante anos dentro do hospedeiro. Estudos realizados comprovaram que 10% dos pacientes portadores do HIV apresentaram *Strongyloides stercoralis* nas fezes (FERREIRA & BORGES, 1996). O diagnóstico é difícil, sendo as larvas encontradas nas fezes, aspirado duodenal, escarro, lavado broncoalveolar e líquido. A não realização de técnicas adequadas nos exames parasitológicos de fezes (métodos de Baerman ou Rugai) pode levar a resultados falsos negativos, aumentando a dificuldade diagnóstica (FERREIRA, 1997).

A esquistossomose mansoni, causada por *Schistosoma mansoni*, é uma das principais endemias parasitárias do país. Apesar do sucesso do programa de controle, estima-se que no Brasil haja cerca de 8 milhões de portadores (CIMERMAN &

CIMERMAN, 1999). Os métodos utilizados para diagnóstico de *Schistosoma mansoni* são o exame parasitológico das fezes, a eclosão de miracídeos, as biópsias retal e hepática. O exame parasitológico das fezes mais adequado, por ser sensível, rápido e de fácil execução é o método de Kato-Katz, que ainda tem a vantagem de ser quantitativo. Outro método muito utilizado é o de Lutz.

Os protozoários intestinais tais como, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *Iodamoeba butschilli*, *Entamoeba hartmanni*, *Giardia intestinalis*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis* entre outros, são detectados por vários métodos parasitológicos de exames de fezes. Os mais utilizados são: direto, método de Faust, métodos de concentração como Lutz, Ritchie, Coprotest®, colorações pela hematoxilina férrica e Ziehl-Neelsen modificado e antígenos nas fezes.

A detecção de protozoários depende de uma coleta correta, do número de amostras submetidas a exame, dos métodos de diagnósticos utilizados e da observação microscópica cuidadosa acompanhada de morfometria. A inexperiência técnica tem levado a erros no diagnóstico de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, já que falsos resultados negativos tem sido observados quando parasitos presentes nas fezes não são identificados. Ocorrem ainda falsos positivos quando leucócitos, outras amebas, células sanguíneas ou artefatos são identificados como *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*. Para eliminar esses erros é importante o uso de colorações como hematoxilina férrica ou tricrômio e a morfometria permite diferenciar *Entamoeba hartmanni* de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*.

O método direto é muito simples e de fácil execução. Uma pequena porção de fezes é misturada com salina entre lâmina e lamínula. Seu objetivo é pesquisar trofozoítas de amebas em fezes diarreicas. Todavia o tempo decorrente da coleta à realização do exame tem sido um fator que dificulta o diagnóstico devido à natureza frágil das amebas. Suspeitando-se de amebíase as amostras deverão ser coletadas e analisadas o mais breve possível, uma vez que os trofozoítas tem um período de vida muito curto no meio externo, entre 15 a 30 minutos. As amostras suspeitas devem chegar ao laboratório até 30 minutos após sua coleta (ISENBERG, 1995).

Para fezes formadas, o diagnóstico laboratorial dos protozoários intestinais é feito pelo encontro de cistos e oocistos, utilizando-se métodos de concentração.

O método de Faust (FAUST *et al.* 1939) é baseado na concentração por centrifugação e flutuação em solução de sulfato de zinco, eficiente para o encontro de protozoários, podendo detectar de 80% a 90% dos cistos.

Ritchie é o método de centrífugo-sedimentação pelo formol éter, eficiente para recuperar e identificar cistos e oocistos de protozoários e ovos e larvas de helmintos (RITCHIE, 1948).

A coloração de Ziehl-Neelsen modificada é uma das mais eficientes para pesquisa de *Cryptosporidium parvum* nas fezes (HENRIKSEN & POHLENZ, 1981).

Hematoxilina férrica é considerado o melhor processo de coloração para trofozoítas e cistos de amebas, permitindo com segurança o diagnóstico da espécie. Esse procedimento usa a hematoxilina como corante e a solução de sulfato férrico amoniacal como mordente e diferenciador (BURROWS, 1965). Esse método apresenta excelentes resultados de coloração quando todas as etapas do procedimento de coloração forem observadas, especialmente durante a diferenciação dos organismos. Os esfregaços podem ser preparados com amostras frescas ou conservadas em líquido de Schaudinn, que proporciona excelente preservação de cistos e trofozoítas de protozoários. Amostras conservadas com formalina a 5% ou 10% não são recomendadas, pois esse conservante distorce os cistos de amebas, dificultando sua visualização. Porém podem ser usados outros conservantes como álcool polivinílico (APV), mertiolato-iodo-formaldeído (MIF) e acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF). Para evitar distorção dos protozoários, não se deve permitir que os esfregaços sequem durante todo o tempo da coloração até a montagem final. Uma série de placas de Petri deverão ser usadas para cada fase do processo de coloração (DE CARLI, 2001).

O método imunoenzimático para antígeno de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* destina-se a detecção qualitativa, em extratos aquosos de fezes humanas do antígeno específico de *Entamoeba histolytica/E. dispar* (AEEH). em cepas patogênicas e não

patogênicas do parasito. Como se trata de um antígeno específico, não apresenta reações cruzadas com outros parasitos intestinais (TIJSSEN, 1985). Amostras de fezes diluídas são colocadas em cavidades da microplaca onde estão ligados os anticorpos anti-antígenos específicos de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*. Se os antígenos estiverem presentes eles serão capturados pelos anticorpos ligados. As cavidades são incubadas e lavadas, a fim de remover o material não ligado, e são adicionados os anticorpos anti-antígenos específicos marcados com enzima peroxidase. Novamente as cavidades são incubadas e lavadas, a fim de remover os anticorpos não ligados marcados com enzima. Numa reação positiva, o antígeno ligará o anticorpo marcado com a enzima ao anticorpo aderido à cavidade e este complexo anticorpo-antígeno-anticorpo marcado desenvolverá uma coloração que pode ser visualmente detectada. Numa reação negativa, como não existem tais antígenos na amostra ou o nível desses antígenos presentes na amostra é insuficiente para ser detectado, não ocorrerá a formação do complexo anticorpo-antígeno-anticorpo marcado, não havendo, portanto, o desenvolvimento de qualquer coloração (TIJSSEN, 1985).

Atualmente, vários reagentes apresentados na forma de “kits” comerciais estão disponíveis no mercado para pesquisa de antígenos nas fezes. Devido a especificidade e sensibilidade serem excelentes, eles são ótimas opções para os laboratórios clínicos (HAQUE *et al.* 1995; WILSON, SCHANTZ, PIENIAZEK, 1995). Estes testes podem determinar a presença de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* e distingui-las de outras amebas como as não patogênicas *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Endolimax nana* e *Iodamoeba butschilli*. A maioria destes testes usam o método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (ONG *et al.* 1996; BRITTEN *et al.* 1997; MIRELMAN, NUCHAMOWITZ, STOLARSKY, 1997). Dentre estes “kits” há o teste TechLab® *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, com 93% de sensibilidade e 97% de especificidade e seu valor é em torno de US\$7.3 por teste; ProSpect® Ensaio Imunoenzimático para *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* em microplaca, com sensibilidade de 87% e especificidade de 99%, varia em média de US\$6.6 por teste; Triage Parasite Panel®, é uma combinação com *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* e *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, com sensibilidade e especificidade de 98%

custando US\$25.5 cada teste. O teste TechLab® *Entamoeba*, com sensibilidade de 93% e especificidade de 94% (ZENGZHU *et al.*, 1999) pode diferenciar *Entamoeba histolytica* de *Entamoeba dispar* a um custo médio de US\$6.0 por teste. Estas metodologias requerem fezes refrigeradas até 48 horas ou congeladas. Fezes preservadas com formalina, SAF e APV não são aceitas (RAMOS *et al.* 1999).

Método da reação da polimerase em cadeia (polymerase chain reaction – PCR) por amostras de ácido desoxirribonucléico (ADN) e ácido ribonucléico (ARN) permite fazer a diferenciação entre *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* (WEISS, 1995; REED, 1995; RAVDIN, 1995; BRITTEN *et al.* 1997; TROLL, MARTI, WEISS, 1997; GOMES *et al.* 1999). A identificação da espécie é necessária, pois, além da *Entamoeba dispar* ser de três a dez vezes mais freqüente que a *Entamoeba histolytica*, ela não é patogênica e não necessita ser tratada. A não diferenciação entre as espécies leva a tratamentos desnecessários com drogas que são potencialmente tóxicas e em muitos casos ineficazes (MIRELMAN *et al.* 1997).

Os protozoários intestinais com maior importância clínica em nosso meio são: *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*, *Blastocystis hominis* e *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*.

Giardia intestinalis é protozoário flagelado do tubo digestivo. A maioria das infecções é assintomática. A giardíase é encontrada no mundo todo, atingindo, principalmente crianças (10 meses a 12 anos). No Brasil, a taxa de prevalência é de 28,5% (GUIMARÃES & SOGAYAR, 1995). Os casos sintomáticos dependem de fatores não bem conhecidos e estão relacionados com: cepas e o número de cistos ingeridos; deficiência imunitária do paciente; e principalmente a uma baixa acidez do suco gástrico. O diagnóstico da giardíase é feito por meio de exame parasitológico de fezes como o Lutz, Faust, Coprotest® e também pelo método imunoenzimático (Ensaio em microplaca Alexon ProSpect Giardia) (MACHADO *et al.* 2001).

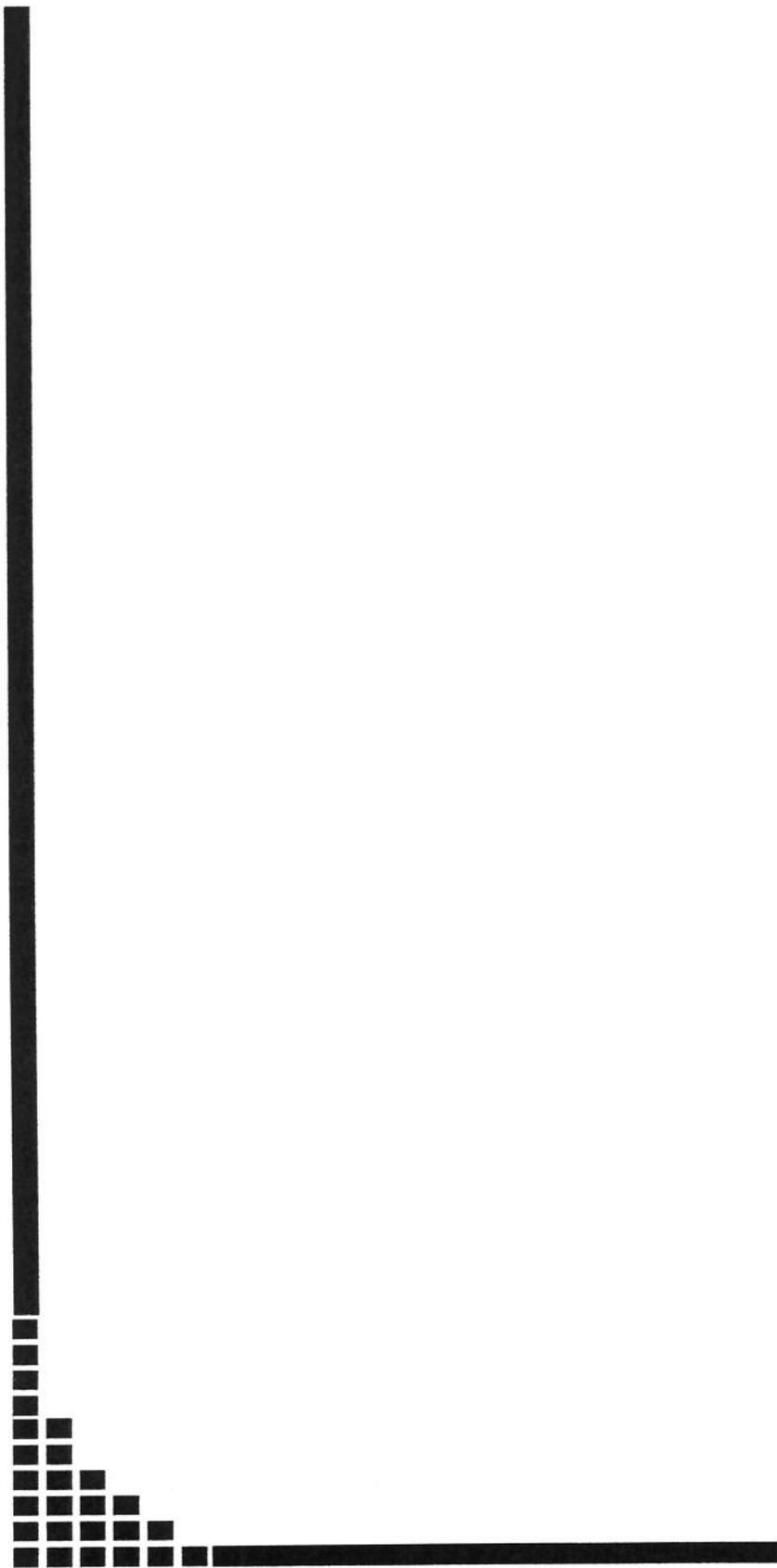
Cryptosporidium parvum não era considerado um patógeno de grande importância clínica para o homem. Com o advento da AIDS, tornou-se um dos mais freqüentes agentes oportunistas causadores de diarreia nesses portadores (SAMPAIO

TEIXEIRA *et al.* 1992). Em dois estudos brasileiros realizados no Rio de Janeiro e Minas Gerais, oocistos de *Cryptosporidium parvum* foram encontrados em respectivamente 18,2% e 13% de pacientes aidéticos (COSTA-CRUZ *et al.* 1996). O diagnóstico é realizado na presença de oocistos nas fezes e corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada (HENRIKSEN & POHLENZ, 1981).

Blastocystis hominis é um protozoário freqüentemente encontrado nas fezes de pessoas com ou sem manifestações gastrointestinais, imunocompetentes e imunossuprimidos (UDKOW & MARKELL, 1993). A maior parte dos portadores de *Blastocystis hominis* não apresenta sintomas específicos e relata dor abdominal, flatulência, alteração do ritmo intestinal, náuseas e vômitos. Em pacientes imunodeprimidos a ocorrência destes sintomas, parece ser mais grave e têm sido descritos quadros de diarreia intensa com desidratação e desnutrição (STENZEL & BOREHAM, 1996). A prevalência de *Blastocystis hominis* no Estado de São Paulo, gira em torno de 2,94% e depende da população estudada e do método utilizado (PIRES DE MATOS *et al.* 1998).

Entamoeba histolytica e *Entamoeba dispar* infecta 10% da população mundial, sendo 90% dos casos assintomáticos. Na região Sul do Brasil, a prevalência varia de 2,5 a 11%. No Sudeste varia de 10 a 20% e em Manaus é de 19% (FERREIRA & ÁVILA, 2001). O diagnóstico da amebíase é feito por exames parasitológicos de fezes como direto, MIF, Faust e coloração de hematoxilina férrica (CIMERMAN & CIMERMAN, 1999). É importante a realização da morfometria, para auxiliar na diferenciação com *Entamoeba hartmanni* e outros comensais do tubo digestivo. A hematoxilina férrica também permite diferenciar hemácias fagocitadas, no citoplasma do protozoário, sendo possível incriminá-la como patogênica (FERREIRA & ÁVILA 2001).

Nota-se que no Brasil não existem trabalhos atuais comparando as diversas técnicas de exame de fezes. A mudança na epidemiologia dos parasitos intestinais, a diminuição de sua carga parasitária e a recente introdução do método Coprotest® na rotina laboratorial são motivos para o estudo de validação das técnicas laboratoriais de exame de fezes. Os novos “kits” imunológicos para *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* também merecem ser avaliados.

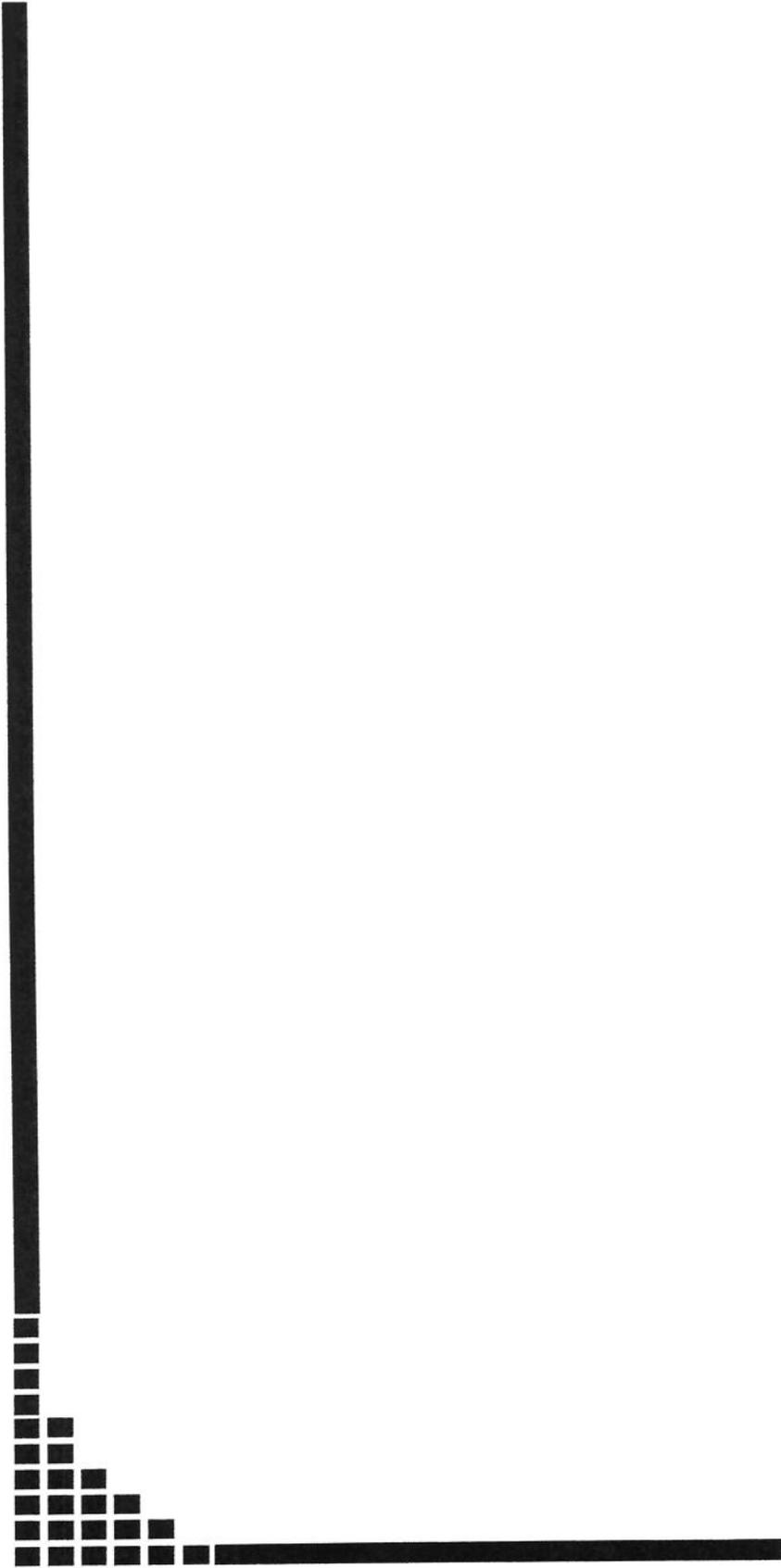


2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral comparar a sensibilidade, especificidade valores preditivos positivo e negativo e concordância (coeficiente Kappa) de diferentes métodos parasitológicos como, Kato-Katz, Coprotest®, Lutz, hematoxilina férrica e imunológico (ELISA) em fezes de pacientes dos Hospitais de Clínicas, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e da Universidade de São Paulo (USP) e do município de Pedro de Toledo (Vale do Ribeira - SP).

Como objetivo específico foram comparados os métodos:

- Kato-Katz e Coprotest® para detecção de helmintos, utilizando amostras de fezes coletadas em indivíduos do município de Pedro de Toledo – São Paulo.
- Coprotest®, Lutz, hematoxilina férrica e ELISA para *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* em pacientes atendidos nos Hospitais de Clínicas, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e Universidade de São Paulo (USP).



3. MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

O estudo comparativo de técnicas parasitológicas para os métodos de Coprotest® e de Kato-Katz foi realizado em amostras de fezes coletadas no município de Pedro de Toledo, no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, no período de 1999 a 2000. Para este estudo foram coletadas amostras de fezes de 440 indivíduos, entre adultos e crianças.

Para comparar os métodos parasitológicos de Lutz, Coprotest® e hematoxilina férrica com o ELISA para antígeno de *E. histolytica/E. dispar*, foram coletadas 86 amostras de fezes de pacientes com história clínica de amebíase intestinal, acompanhados nos ambulatórios e enfermarias dos Hospitais de Clínicas, da UNICAMP e da USP (SP), no período de maio de 1999 a junho de 2000.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Faculdade de Ciências Médicas, da UNICAMP (Processo n° 57/2000).

Técnicas Parasitológicas

As técnicas utilizadas para helmintos foram Kato-Katz e Coprotest® e para protozoários, Coprotest®, Lutz, hematoxilina férrica e ELISA.

Técnica de Kato-Katz

As fezes à fresco foram coletadas no campo (Pedro de Toledo), em coletor universal e processadas dentro de 24 horas. Para a realização da técnica de Kato-Katz (KATZ *et al.*, 1972), transferiu-se, com auxílio de espátula de madeira, uma porção de fezes para uma folha de papel. Procedeu-se a tamização das fezes em tela de 105 malhas por polegada quadrada, sendo recolhido o material tamizado com outra espátula. Em seguida, esse material foi transferido para um orifício de 6mm de diâmetro, em um cartão de plástico perfurado que era colocado sobre uma lâmina de microscopia. Todo o orifício foi

preenchido com fezes (volume fecal correspondente a aproximadamente 43mg). Tirou-se o cartão perfurado, permanecendo as fezes na lâmina. As fezes foram então cobertas com papel celofane com as dimensões de uma lamínula de 32x24mm, embebido previamente em solução de verde de malaquita a 3% diluída em partes iguais de glicerina e água (KATZ *et al.* 1972). Em seguida, inverteu-se a lâmina e por pressão digital o material foi uniformemente distribuído no papel celofane (Figura 1). Foram realizadas três lâminas por paciente. As lâminas permaneceram em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente para clarificação do preparado. Em seguida o material foi todo examinado ao microscópio e feita a contagem dos ovos. O número médio de ovos encontrados nos três esfregaços fecais foi multiplicado pelo fator 24, o que corresponde ao número de ovos por grama de fezes (opg). A leitura das lâminas foi realizada dentro de duas horas, com finalidade de preservar a morfologia dos ovos de ancilostomatídeos, pois, após esse tempo, os ovos superclarificados, não aparecem convenientemente e nos lugares ocupados por eles ficam áreas claras.

A intensidade de infecção de ovos por grama de fezes foi avaliada segundo critérios de REY (1991), PÊSSOA & MARTINS (1982) e WHO (1993) (Quadro 1).

Quadro 1: Classificação da intensidade de infecção, segundo número de ovos por grama de fezes (WHO, 1993 ; Rey, 1991 e Pessoa, 1982).

Parasitas	Intensidade de Infecção		
	Leve	Moderada	Intensa
<i>Ascaris lumbricoides</i>	< 5.000	5.001 – 10 000	> 10.000
<i>Trichuris trichiura</i>	< 5.000	5.001 – 10 000	> 10.000
Ancilostomatídeos	< 2.600	2.601 – 12.600	> 12.600
<i>Schistosoma mansoni</i>	< 100	101 - 400	> 400

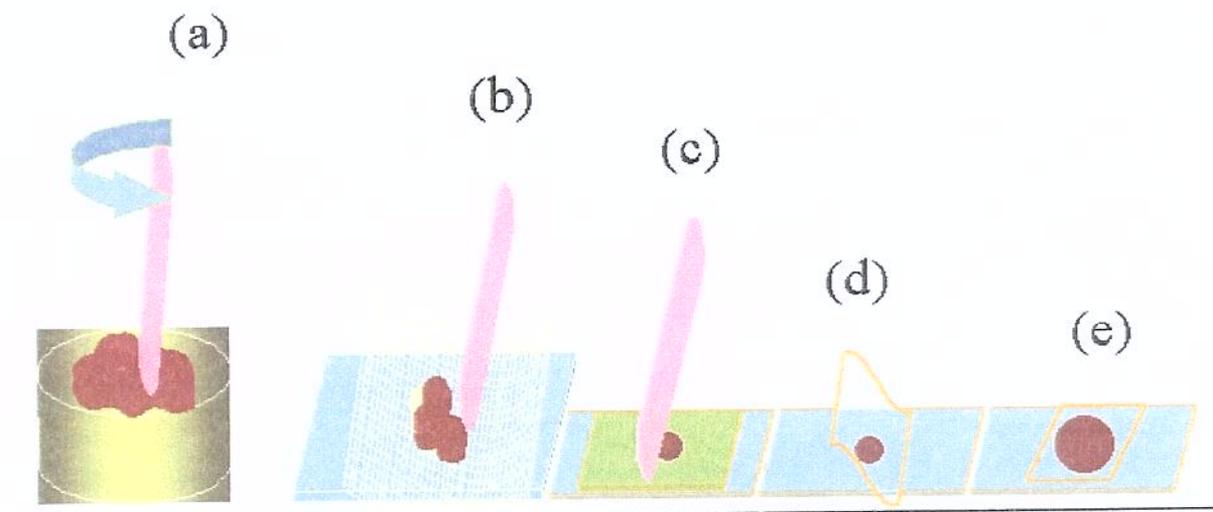


Figura 1: Esquema do processamento de amostras pelo método de Kato-Katz

a) frasco contendo fezes: homogeneização do material fecal; b) transferência de uma porção de fezes para uma folha de papel e tamização em tela de 105 malhas por polegada quadrada, recolhendo o material tamizado com uma espátula limpa; c) transferência das fezes tamizadas para um cartão perfurado disposto sobre uma lâmina de vidro, preenchendo todo o espaço (volume fecal correspondente à cerca de 43mg); d) retirada do cartão e encobrimento da alíquota de fezes com uma lamínula de celofane previamente embebida em solução glicerínada de verde de malaquita; e) inversão da lâmina sobre uma superfície lisa e compressão das fezes de forma a se obter um esfregaço uniforme com cerca de 22mm de diâmetro.

Técnica de Coprotest®

As fezes foram coletadas no campo, à fresco, em coletor universal. O processamento da técnica do Coprotest® foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (NL-Comércio Exterior Ltda – SP –Brasil), com uma pequena modificação: a agitação dos tubos com acetato de etila foi feita manual e individualmente ao contrário da instrução do fabricante que preconiza agitação em estante. Foram colocadas fezes no coletor próprio do kit (com capacidade de 1,4 gramas) (Figura 2) e introduzidas em frasco com 10ml de solução de formalina a 10% tamponada (pH 7,2). O material foi homogeneizado manualmente. Com pressão manual do frasco transferiu-se 7ml da suspensão fecal através de peneira (com orifício de 400µm) acoplada à tampa do sistema, para um tubo de centrifuga de 10ml. Adicionou-se uma gota de detergente doméstico e 3ml de acetato de etila comercial e homogeneizou-se manualmente, sendo centrifugado durante 2 minutos a 1.500 rpm. Depois, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso a 7ml com água destilada. Nova centrifugação foi realizada por 2 minutos a 1.500 rpm. Descartou-se o sobrenadante. O sedimento foi diluído com três gotas de solução salina a 0,85% e pipetado com auxílio de uma pipeta Pasteur e colocado sobre uma lâmina (Figura 2). Foi adicionada uma gota de lugol ao sedimento. O mesmo foi coberto com uma lamínula de 32x24mm. Em seguida o material foi examinado ao microscópio. Para cada paciente realizou-se a leitura de três lâminas. A leitura foi realizada percorrendo toda a lamínula com objetiva de 100x e revisada novamente com objetiva de 400x.

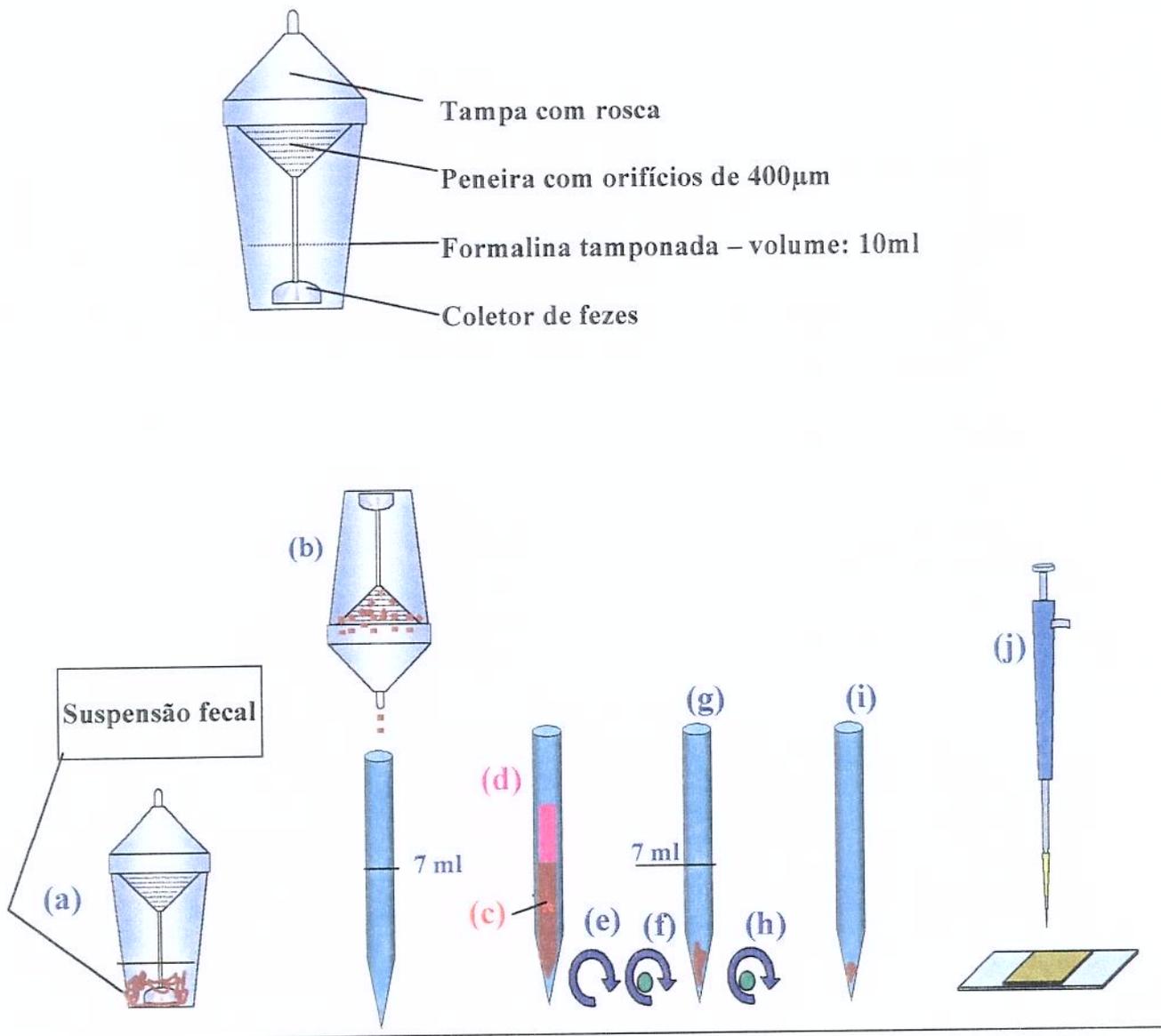


Figura 2: Esquema do processamento das fezes através do Método de Coprotest®

a) homogeneização do material fecal; b) transferência de 7 ml da suspensão obtida para um tubo de centrífuga de 10ml; c) adição de 1 gota de detergente doméstico; d) adição de 3ml de acetato de etila comercial; e) homogeneização através de agitação manual vigorosa; f) centrifugação durante 2 minutos a 1.500 rpm; g) descarte do sobrenadante e ressuspensão do sedimento a 7ml, com água destilada; h) nova centrifugação por 2 minutos a 1.500 rpm e descarte do sobrenadante; i) ressuspensão do sedimento com 3 gotas de solução salina a 0,85%; j) preparo das lâminas para observação ao microscópio.

Técnica de Lutz

As fezes foram acondicionadas em coletores universais, contendo líquido conservante de Schaudinn, na proporção de uma parte de fezes para três partes de Schaudinn. Homogeneizou-se as fezes com auxílio de uma espátula de madeira, transferindo aproximadamente 10 gramas do material conservado em 10ml de água destilada para um copo plástico. Em seguida o material foi filtrado em gaze dobrada em 4 vezes para um cálice cônico completando-se o volume para 100ml com água destilada. A emulsão de fezes foi deixada em repouso durante uma hora (LUTZ, 1919). Findo esse tempo, o sedimento foi coletado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e colocado sobre uma lâmina (Figura 3). Adicionou-se uma gota de lugol e cobriu-se com lamínula de 32x24mm, sendo a preparação examinada ao microscópio. Realizou-se a leitura de apenas uma lâmina por paciente. A leitura foi realizada percorrendo toda a lamínula em 100x e depois revisada com aumento de 400x.

Técnica de hematoxilina férrica

As fezes foram colhidas pelo paciente em coletor universal sem conservante e entregues ao laboratório até 24 horas após a evacuação. Uma parte desse material foi congelada a -20°C para posterior realização do método enzimático para detecção do antígeno de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* (ELISA). A outra parte das fezes foi colocada no líquido conservante de Schaudinn, misturada na proporção de uma parte de fezes para três partes de Schaudinn, para a realização da hematoxilina férrica. Fez-se um esfregaço fino em duas lamínulas de 20x20mm. Estas foram presas em um simples fragmento de rolha de borracha, com um entalhe lateral para manipulação (Figura 4) Foram imersas sucessivamente em álcoois 50%, 70% iodado, 70% e 50% por 2 minutos em cada um. Na etapa seguinte, foram lavadas em água corrente e colocadas em solução de alúmen de ferro a 2% por 10 minutos.

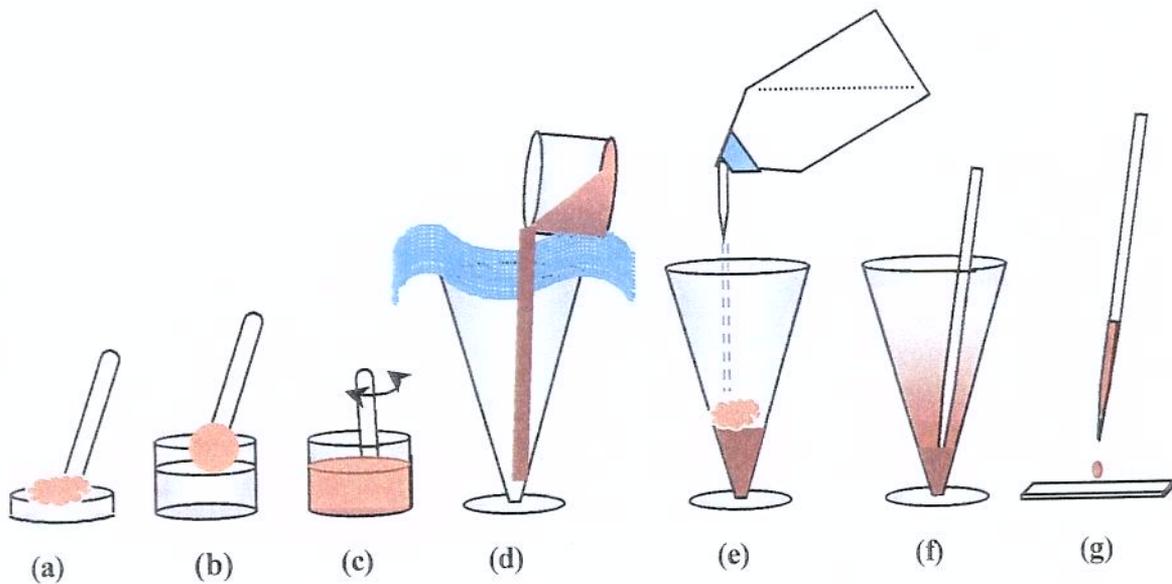


Figura 3: Esquema do processamento de amostras pelo método de Lutz

- a) frasco contendo fezes: homogeneização do material fecal; b) transferência de aproximadamente 10 gramas de fezes para um copo com 10 ml de água destilada; c) homogeneização através de agitação manual vigorosa; d) material filtrado em gaze dobrada 4 vezes sobre um cálice cônico; e) adição de aproximadamente 100 ml de água destilada; f) material em repouso por uma hora e coletado com auxílio de uma pipeta; g) preparo das lâminas para observação ao microscópio.

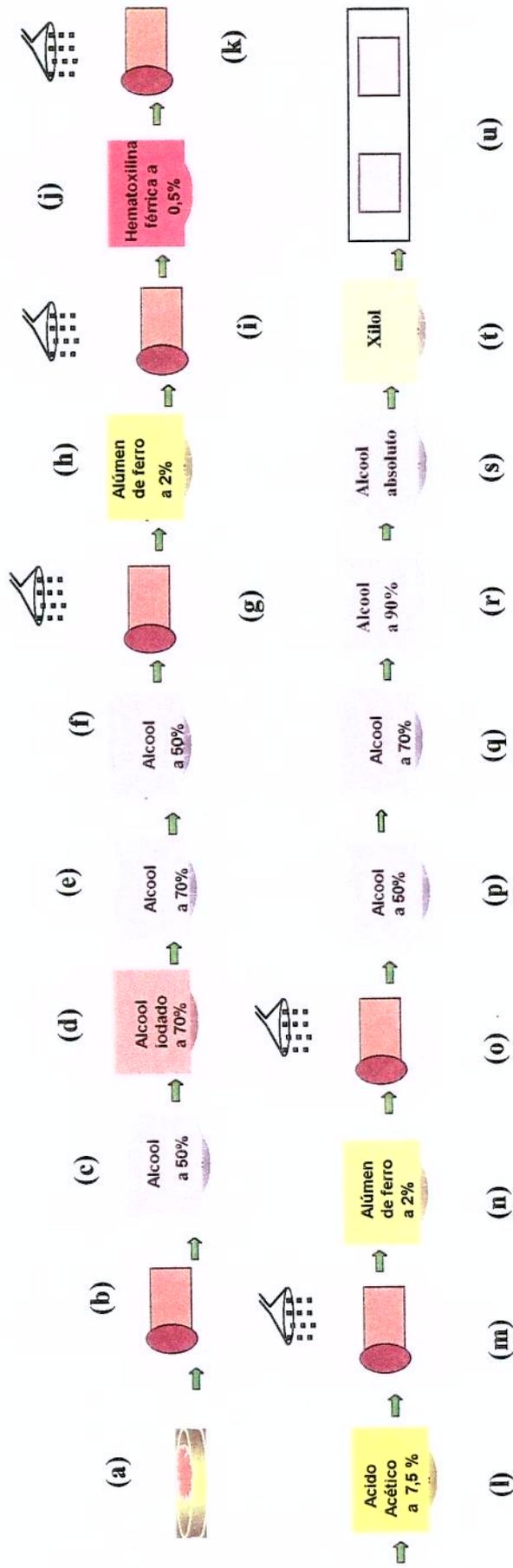


Figura 4: Esquema do processamento de amostras pelo método de hematóxilina férrica

a) frasco contendo fezes; b) esfregaço fino em lamínula de 20x20mm; c-d-e-f) lamínulas imersas sucessivamente em álcoois 50%, 70% iodado, 70% e 50%, 2 minutos cada um; g) lamínulas lavadas em água corrente; h) alúmen de ferro a 2% por 10 minutos; i) lavagem em água corrente; j) coloração em hematóxilina férrica a 0,5% por 5 minutos; k) lavagem em água corrente por 2 minutos; l) solução de ácido acético a 7,5% por 5 minutos; m) lavagem em água corrente; n) diferenciação em alúmen de ferro a 2%; o) lavagem em água corrente por 2 minutos; p-q-r-s) passagem sucessivamente pela série de álcoois a 50%, 70%, 90% e absoluto, 2 minutos cada um; t) passagem pelo xilol 1 minuto; u) montagem em balsamo de canadá sobre lâmina de microscopia

Em seguida, foram novamente lavadas em água corrente e coradas em solução aquosa de hematoxilina férrica a 0,5%, durante 5 minutos. Depois de nova lavagem em água corrente por 2 minutos, foram colocadas em solução de ácido acético a 7,5% por 5 minutos. Realizou-se nova lavagem e foi feita a diferenciação em solução de alúmen de ferro a 2% durante tempo suficiente para que o esfregaço adquirisse uma coloração cinza-azulada clara (BURROWS, 1965). Após mais uma lavagem em água corrente por 2 minutos, foram passadas sucessivamente pela série de álcoois a 50%, 70%, 90% e absoluto, 2 minutos em cada um. Depois de serem clarificadas pelo xilol por 1 minuto, foi feita sua montagem sobre lâmina de microscopia com uma gota de bálsamo de Canadá (Figura 4). O material constituído por uma lâmina com duas lamínulas foi examinado ao microscópio com objetiva de imersão (1000x). Cada lamínula montada foi examinada por dez minutos.

Morfometria

As medidas das formas parasitárias foram realizadas com ocular micrométrica. Para cada lâmina examinada com presença de cistos suspeitos de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* ou *Entamoeba hartmanni* foi realizada a morfometria de 10 cistos. O micrômetro ocular é um retículo colocado a meio caminho entre as duas lentes da ocular. É importante que o retículo seja inserido em uma das oculares do microscópio.

Antes de fazer qualquer medida ao microscópio, este deve ser calibrado. A calibragem é feita pela sobreposição da escala do micrômetro ocular com a escala do micrômetro objetivo, que tem 2mm de comprimento e está dividida em 200 unidades, de 0,01mm de 10 micrômetros cada. Com o micrômetro objetivo sobre a platina, focaliza-se a escala e roda-se a ocular, de modo a fazer com que as escalas dos dois retículos se sobreponham, e a primeira linha do micrômetro ocular (a que marca o 0) é colocada sobre uma linha da escala do micrômetro objetivo que será considerada como 0.

Para calibrar o micrômetro ocular é aconselhável usar-se a escala inteira ou a porção mais longa que ofereça dois pontos perfeitamente coincidentes com duas linhas quaisquer sobre a escala do micrômetro objetivo.

Sabendo-se o valor em micrômetros para cada divisão do micrômetro ocular, basta contar quantas divisões do micrômetro ocular mede uma determinada estrutura e multiplicar esse número pelo valor em micrômetros da unidade correspondente à objetiva utilizada na observação (DE CARLI, 2001).

Técnica Imunológica

Ensaio Imunoenzimático para Detecção do Antígeno Específico em *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*.

As amostras de fezes coletadas foram guardadas em dois frascos, sendo um com material conservado em Schaudinn na proporção de uma parte de fezes para três partes do Schaudinn, para preparação das técnicas parasitológicas (Lutz, Coprotest® e hematoxilina férrica) e o outro congelado sem conservantes a uma temperatura de -20°C para a técnica imunológica.

Para a realização da técnica imunológica, utilizou-se um conjunto de reagentes e acessórios fabricado pela Alexon® Inc (ProsPect) composto por microplaca (cavidades fixadas com anticorpos anti-antígeno específico de *Entamoeba histolytica* de coelho), um frasco de conjugado enzimático, um frasco de controle positivo, um frasco de controle negativo, um frasco de tampão para diluição da amostra, um frasco de tampão para lavagem, um frasco de solução de substrato e um frasco de solução bloqueadora da reação (solução "stop").

De acordo com as instruções do fabricante, as fezes foram descongeladas e homogeneizadas por meio de espátula de madeira para garantir uma distribuição uniforme dos antígenos. Pipetou-se 1ml da solução tampão da amostra em cada tubo de ensaio com identificação do paciente (Figura 5). Revestiu-se completamente um "swab" com o material fecal contido no frasco, introduzindo-o no tubo com o tampão para diluição da amostra e a seguir girando-o várias vezes para que houvesse aderência do material fecal em solução. Rodou-se o swab firmemente contra a lateral do tubo a fim de retirar o máximo possível de fezes. Em cavidades individuais, adicionaram-se quatro gotas do controle negativo, quatro

gotas do controle positivo e quatro gotas da amostra diluída do paciente, tomando cuidado para não contaminar as cavidades adjacentes. Incubou-se a placa em temperatura ambiente por 60 minutos. A cronometragem foi feita após a adição da última amostra. Após esse tempo, decantou-se o conteúdo das cavidades e realizou-se uma lavagem preenchendo-se cada cavidade com tampão diluído 1:10 (uma parte do concentrado para 9 partes de água destilada) até que houvesse remoção de todo líquido das cavidades. Foram realizadas três lavagens e em seguida, foram acrescentadas quatro gotas do conjugado enzimático a cada amostra. A placa foi mantida em temperatura ambiente por mais trinta minutos e após esse tempo, novamente decantou-se e lavou-se cada cavidade por cinco vezes com tampão de lavagem. Na etapa seguinte foram acrescentadas para cada amostra, quatro gotas de solução de substrato colorido com nova incubação à temperatura ambiente por mais dez minutos. Ao término desse tempo, acrescentou-se uma gota de solução “stop” a cada cavidade, seguida de uma leve agitação em toda placa para que houvesse uniformidade de cor no final da reação. A leitura foi realizada dez minutos após e os resultados do teste foram comparados com as cores da reação do cartão de referência de coloração do ensaio. Resultado negativo foi incolor e positivo quando a cor se tornou amarela de intensidade de uma cruz (+), no mínimo.

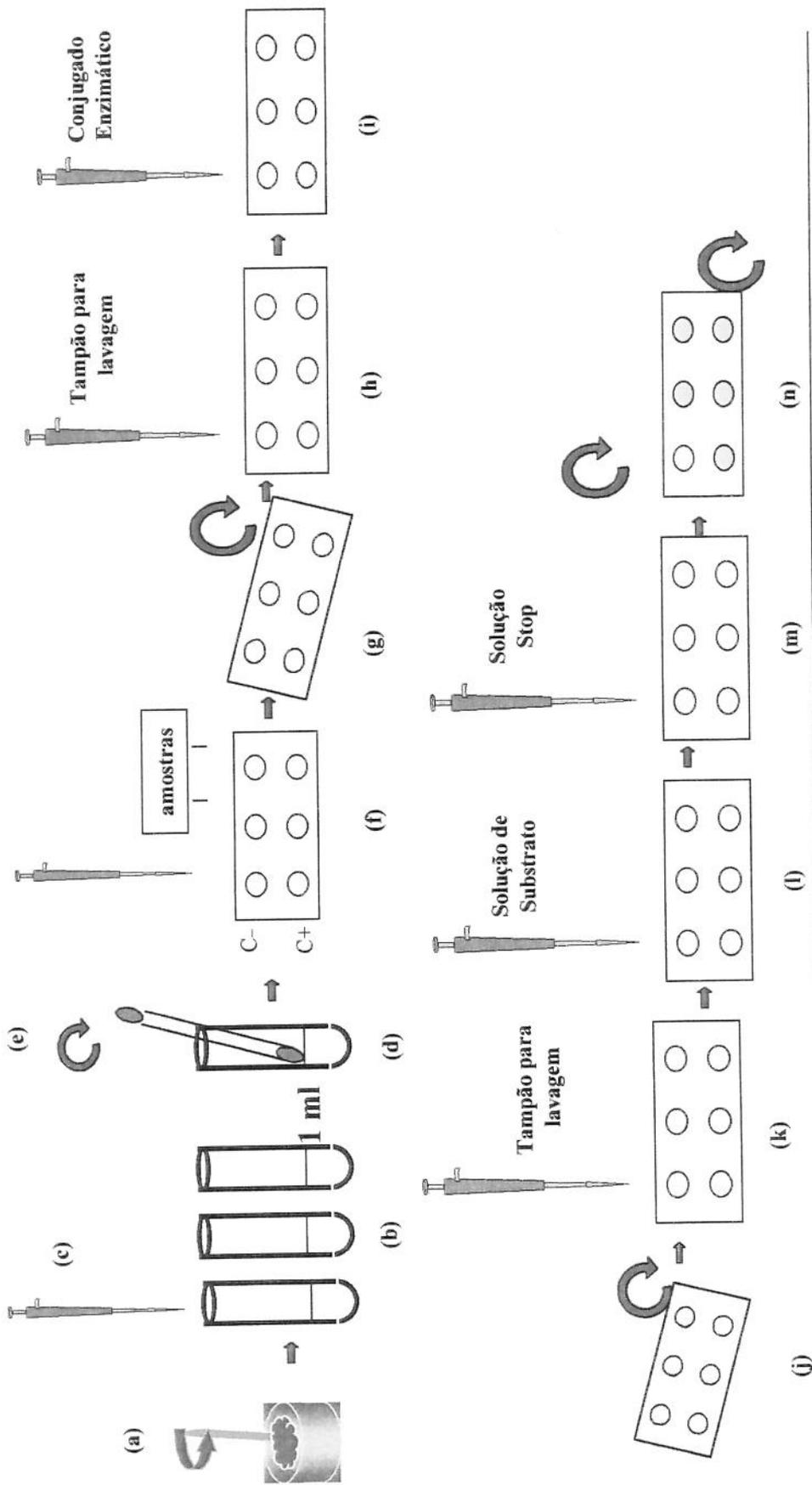


Figura 5: Esquema do processamento das amostras pelo método imunoenzimático para detecção de antígenos nas fezes

a) frasco contendo fezes; b) tubos de ensaio com identificação do paciente; c) adição de 1 ml do tampão para diluição da amostra em cada tubo; d) transferência do material fecal com swab para o tubo contendo o tampão de diluição da amostra; e) swab sendo girado várias vezes para causar a suspensão do material fecal em solução; f) adição de 4 gotas de controle negativo, controle positivo e amostra do paciente dentro das cavidades individuais; g) remoção do material; h) lavagem de cada cavidade com tampão para lavagem; i) adição de 4 gotas do conjugado enzimático em cada cavidade; j) remoção do material; k) lavagem de cada cavidade; l) adição de 4 gotas de solução de substrato a cada cavidade; m) adição de 1 gota de solução stop a cada cavidade; n) homogeneização das cavidades até o amarelo ficar uniforme e leitura manual dentro de 10 minutos

Análise Estatística

Utilizando o programa Epi-Info da Organização Mundial de Saúde (DEAN *et al.*, 1995), foram montados os arquivos I e II, que serviram para cadastramento dos indivíduos e respectivos resultados laboratoriais para análise dos dados. No arquivo I (ANEXO 1), além da identificação, constam dados referentes dos métodos de hematoxilina férrica, Lutz, Coprotest® e ELISA. No arquivo II (ANEXO 2), além da identificação, há dados dos métodos de Kato-Katz e Coprotest®.

Verificou-se então a relação entre os métodos para cada parasito, utilizando-se tabelas de dupla entrada para cruzamento dos resultados com o respectivo padrão-ouro (FLEISS, 1981). Por meio dessas tabelas obtiveram-se as seguintes medidas de exatidão em relação ao padrão-ouro:

- a- Sensibilidade: é a proporção de indivíduos com o parasito (segundo o padrão-ouro) que tem um teste positivo para o mesmo;
- b- Especificidade: é a proporção de indivíduos sem o parasito (segundo o padrão-ouro) que tem um teste negativo;
- c- Valor preditivo positivo: é a probabilidade da presença de parasito (segundo o padrão-ouro) em um paciente com o resultado do teste positivo;
- d- Valor preditivo negativo: é a probabilidade de não ter o parasito (segundo o padrão-ouro) quando o resultado do teste é negativo.

Para avaliar a concordância de resultados entre os métodos, calculou-se o coeficiente Kappa (K), também conhecido como coeficiente de correlação intraclass. Esse coeficiente pode assumir valores de -1 a +1. Valores próximos de +1 indicam total concordância entre os métodos, enquanto que valores próximos a -1 indicam total discordância. Valores maiores que 0,75 representam ótima concordância e valores de Kappa abaixo de 0,40 indicam uma fraca concordância. Os valores de Kappa no intervalo de 0,40 a 0,75, representam uma concordância intermediária.



4. RESULTADOS

Foram recebidas amostras de fezes de 440 indivíduos do Município de Pedro de Toledo, SP. Devido a amostras insuficientes para executar as duas técnicas ou por serem fezes líquidas inadequadas para a realização do método de Kato-Katz, foram feitos 337 exames para o método de Kato-Katz e 364 para o método de Coprotest®.

Entre os helmintos, a maior frequência foi observada para *Ascaris lumbricoides*, 28,5% para Coprotest® e 34,4% para Kato-Katz (Tabela 1) e entre os protozoários para *Entamoeba coli*, 12,6% no Coprotest® (Tabela 2).

Dentre as 440 amostras foi possível fazer uma comparação dos métodos Coprotest® e Kato-Katz para helmintos em um total de 332 amostras (Tabela 3) e para os ancilostomatídeos foi possível comparar somente 202 amostras. Destaca-se diferença significativa na taxa de infecção de *Trichuris trichiura* pelos métodos de Kato-Katz (16,2%) e Coprotest® (7,5%).

Adotando-se o método de Kato-Katz como padrão, calculou-se as medidas de exatidão com relação ao Coprotest® para helmintos intestinais, em 332 amostras de fezes (Tabela 4). As medidas de exatidão para *Ascaris lumbricoides* foram bastante concordantes entre as duas técnicas (Kappa de 0,81).

Devido à discrepância das percentagens observadas em indivíduos parasitados por *Trichuris trichiura*, 7,5% pelo Coprotest® e 16,2% pelo Kato-Katz (Tabela 3), comparou-se amostras positivas e negativas do método de Coprotest® (método qualitativo) com o número de ovos por grama de fezes obtido pelo método de Kato-Katz (Tabela 5). Quando o método de Coprotest® foi negativo, o número de ovos por grama de fezes pelo Kato-Katz foi menor (65) e quando o Coprotest® foi positivo, o número de ovos por grama de fezes para Kato-Katz foi maior (199).

Tabela 1: Frequência de helmintos intestinais em indivíduos do município de Pedro de Toledo, SP, pelos métodos de Coprotest® e Kato-Katz

Parasitos	MÉTODOS			
	<u>COPROTEST® (364)</u>		<u>KATO-KATZ(337)</u>	
	Nº	%	Nº	%
<i>Ascaris lumbricoides</i>	104	28,5	116	34,4
<i>Trichuris trichiura</i>	27	7,4	54	16,0
Ancilostomátídeos	32	8,8	17	5,0
<i>Strongyloides stercoralis</i>	51	14,0	0	0
<i>Enterobius vermicularis</i>	5	1,4	0	0
<i>Schistosoma mansoni</i>	3	0,8	7	2,1
<i>Hymenolepis nana</i>	4	1,1	0	0

OBS.: () Número de amostras examinadas por método

Tabela 2: Frequência de protozoários intestinais em 364 indivíduos do município de Pedro de Toledo, pelo método de Coprotest®

Parasitas	Coprotest®	
	Nº	%
<i>Entamoeba coli</i>	46	12,6
<i>Endolimax nana</i>	38	10,5
<i>Giardia intestinalis</i>	23	6,3
<i>Blastocystis hominis</i>	18	5,0
<i>Iodamoeba butschlii</i>	4	1,1
<i>Entamoeba histolytica /E. dispar</i>	4	1,1

Tabela 3: Comparação dos métodos de Coprotest® e Kato-Katz em fezes de 332 indivíduos do município de Pedro de Toledo – SP.

Parasitos	MÉTODOS							
	COPROTEST®				KATO-KATZ			
	Nº	%	I.C.	Nº	%	I.C.	Nº	I.C.
<i>Ascaris lumbricoides</i>	95	28,6	23,9 - 33,9	111	33,4	29,0 - 39,5		
<i>Trichuris trichiura</i>	25	7,5	5,0 - 11,0	54	16,2	12,5 - 20,7		
Ancilostomatídeos (202)	20	9,9	6,3 - 15,0	17	8,4	5,1 - 13,3		
<i>Schistosoma mansoni</i>	3	0,9	0,2 - 2,8	7	2,1	0,9 - 4,4		

OBS: (202) nº de amostras examinadas

I.C. = intervalo de confiança com 95%

Tabela 4: Avaliação do método de Coprotest® em relação ao método de Kato Katz (padrão) para helmintos intestinais em 332 amostras de fezes de indivíduos, do município de Pedro de Toledo, SP.

Parasitas	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VP+ (%)	VP- (%)	Kappa
<i>Ascaris lumbricoides</i>	80,5	98,1	95,7	90,7	0,81
<i>Trichuris trichiura</i>	89,9	72,5	99,3	42,6	0,54
Ancilostomatídeos (202)	52,9	94,1	45,0	95,6	0,43
<i>Schistosoma mansoni</i>	28,6	99,7	66,6	98,4	0,39

OBS.: VP+ = Valor Preditivo Positivo

VP- = Valor Preditivo Negativo

(202) = Número de amostras examinadas

Tabela 5: Comparação entre amostras positivas e negativas do método de Coprotest® quanto ao número de ovos por grama de fezes detectado pelo método de Kato Katz.

Parasitas	Coprotest®	Kato-Katz	Nº	Média de OPG			NCP *
				Aritmética	Geométrica		
<i>Ascaris lumbricoides</i>	+	+	91	7589	5317		Moderada
	-	+	20	1778	788,0		Leve
<i>Trichuris trichiura</i>	+	+	23	815	199,0		Leve
	-	+	28	112	65,0		Leve
<i>Ancilostomatídeos</i>	+	+	9	102	65,5		Leve
	-	+	6	15	13,6		Leve
<i>Schistosoma mansoni</i>	+	+	2	22,5	20,8		Leve
	-	+	5	194	44,8		Moderada

OBS.: OPG = ovos por grama de fezes

NCP = níveis de carga parasitária

* = segundo quadro I

A intensidade de infecção por helmintos foi mais intensa para *Ascaris lumbricoides*, 49% (Tabela 6).

Ao compararmos Coprotest®, hematoxilina férrica, Lutz e ELISA em 86 amostras provenientes de pacientes dos Hospitais de Clínicas, da UNICAMP e da USP, podemos observar uma maior frequência para *Entamoeba coli* com 67,4% para Coprotest® e 68,6% para hematoxilina férrica e Lutz (Tabela 7). Foi obtido um Kappa de 0,92 entre hematoxilina férrica/Coprotest® e Kappa de 0,89 entre hematoxilina férrica/Lutz (Tabela 8); para *Entamoeba histolytica/E. dispar* registrou-se um índice de prevalência de 47,7% para Coprotest® e Lutz, 50,0% para hematoxilina férrica e ELISA (Tabela 7), com um Kappa de 0,97 entre hematoxilina férrica/ Coprotest®, e entre hematoxilina férrica/Lutz e Kappa de 1,00 entre hematoxilina férrica/ELISA (Tabela 9). Para *Entamoeba hartmanni* houve concordância total entre todos os métodos (Kappa =1,00) e para *Blastocystis hominis* houve uma fraca concordância entre os métodos hematoxilina férrica/ Coprotest® com Kappa de 0,42 (Tabela 8).

Foi realizada morfometria de cistos em 51 amostras coradas pela hematoxilina férrica, sendo 43 positivas para *Entamoeba histolytica/E. dispar* e 8 para *Entamoeba hartmanni*. Os cistos de *Entamoeba histolytica/E. dispar* mediram 12,50 μ m ((\pm .1,2) e os de *Entamoeba hartmanni* 8,43 μ m (\pm 0,36).

Tabela 6: Intensidade de infecção de helmintos, segundo método de Kato-Katz, em amostras de fezes de indivíduos do município de Pedro de Toledo – SP.

Parasitas	Intensidade de Infecção			
	Nº de Parasitados	Leve	Moderada	Intensa
<i>Ascaris lumbricoides</i>	111	40%	9%	49%
<i>Trichuris trichiura</i>	54	98%	0%	2%
Ancilostomatídeos (202)	17	100%	0%	0%
<i>Schistosoma mansoni</i>	7	86%	0%	14%

OBS: (202) = número de examinados

Tabela 7: Frequência de parasitos intestinais pelos métodos de Coprotest®, hematoxilina férrica, Lutz e ELISA para *Entamoeba histolytica/E. dispar* em 86 amostras de fezes de pacientes dos Hospitais de Clínicas, da UNICAMP e da USP (SP)

Parasitos	MÉTODOS PARASITOLÓGICOS						MÉTODOS IMUNOLÓGICOS			
	COPROTEST®		HEMATOXILINA FÉRRICA		LUTZ		ELISA			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>Entamoeba coli</i>	58	67,4	59	68,6	59	68,6	0	0,0	0	0,0
<i>Endolimax nana</i>	17	19,8	18	20,9	14	16,3	0	0,0	0	0,0
<i>Entamoeba histolytica/E. dispar</i>	41	47,7	43	50,0	41	47,7	43	50,0	43	50,0
<i>Entamoeba hartmanni</i>	8	9,3	8	9,3	8	9,3	0	0,0	0	0,0
<i>Blastocystis hominis</i>	21	24,4	10	11,6	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>Iodamoeba butschlii</i>	3	3,5	5	5,8	4	4,7	0	0,0	0	0,0
<i>Giardia intestinalis</i>	3	3,5	3	3,5	4	4,7	0	0,0	0	0,0
<i>Ancilostomatídeos</i>	1	1,2	0	0,0	1	1,2	0	0,0	0	0,0
<i>Ascaris lumbricoides</i>	3	3,5	0	0,0	4	4,7	0	0,0	0	0,0
<i>Trichuris trichiura</i>	5	5,8	0	0,0	4	4,7	0	0,0	0	0,0
<i>Hymenolepis nana</i>	5	5,8	0	0,0	5	5,8	0	0,0	0	0,0

Tabela 8: Avaliação dos métodos de Coprotest® e Lutz usando a hematoxilina férrica como padrão para protozoários intestinais em 86 amostras de fezes de pacientes dos Hospitais de Clínicas, da UNICAMP e da USP (SP).

Protozoários	Métodos	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VP+ (%)	VP- (%)	Kappa
<i>Entamoeba coli</i>	Coprotest	96,1	96,3	98,2	92,8	0,92
	Lutz	96,6	92,5	96,6	92,5	0,89
<i>Endolimax nana</i>	Coprotest	88,8	98,5	94,1	97,1	0,89
	Lutz	77,8	100,0	100,0	94,4	0,84
<i>Entamoeba hartmanni</i>	Coprotest	100,0	100,0	100,0	100,0	1,00
	Lutz	100,0	100,0	100,0	100,0	1,00
<i>Blastocystis hominis</i>	Coprotest	80,0	82,8	38,0	96,9	0,42
<i>Iodamoeba butschlii</i>	Coprotest	60,0	100,0	100,0	97,6	0,73
	Lutz	80,0	100,0	100,0	98,8	0,88
<i>Giardia intestinalis</i>	Coprotest	66,6	98,8	66,6	98,8	0,65
	Lutz	100,0	98,8	75,0	100,0	0,85

OBS: VP+ = Valor Preditivo Positivo

VP- = Valor Preditivo Negativo

Tabela 9: Avaliação dos métodos de Coprotest®, Lutz e ELISA para *Entamoeba histolytica/E. dispar* usando a hematoxilina férrica como padrão, em 86 amostras de fezes de pacientes dos Hospitais de Clínicas, da UNICAMP e da USP (SP)

Métodos	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VP+ (%)	VP- (%)	Kappa
Coprotest	97,6	100,0	100,0	97,8	0,97
Lutz	97,6	100,0	100,0	97,8	0,97
ELISA	100,0	100,0	100,0	100,0	1,00

OBS: VP+ = Valor Preditivo Positivo

VP- = Valor Preditivo Negativo



5. DISCUSSÃO

A aplicação de diferentes métodos de exame de fezes torna-se necessária tendo em vista a variabilidade morfológica e biológica apresentada pelos parasitos. Nem sempre uma técnica apropriada ao encontro de ovos será eficiente na detecção de larvas de helmintos e cistos ou oocistos de protozoários. A utilização de técnicas capazes de detectar outros elementos parasitários que não somente aqueles em enfoque poderia trazer maiores benefícios a população.

Ao compararmos os métodos Coprotest® e Kato-Katz (Tabela 3), foi usado o método de Kato-Katz como padrão, uma vez que o kit comercial Coprotest® foi recentemente lançado no mercado e era de nosso interesse avaliar seu desempenho, comparando-o com técnicas já usadas em laboratórios de Patologia Clínica. Nota-se que Kato-Katz foi superior ao Coprotest® na detecção de ovos de *Trichuris trichiura* (Tabela 3).

Ao compararmos os métodos de Kato-Katz e Coprotest® para ancilostomatídeos, constatamos que o índice Kappa foi de apenas 0,43, indicando uma baixa concordância (Tabela 4). Quando ambos os métodos foram positivos (Tabela 5), a média geométrica de ovos por grama de fezes para Kato-Katz foi maior (65,5 opg) e quando o Coprotest® foi negativo com Kato-Katz positivo, essa média foi menor (13,6 opg). Neste caso, o resultado foi dependente da quantidade de ovos na amostragem analisada. Podemos observar que a média aritmética e geométrica para ancilostomatídeos foram calculadas para 15 amostras positivas (Tabela 5) e não para 17 como mostra a Tabela 3. Não foi possível realizar a contagem de ovos no material desses dois indivíduos. Embora positivo, o material enegrecido não foi clarificado satisfatoriamente, impedindo uma contagem precisa. A mesma situação ocorreu para o cálculo das médias aritmética e geométrica de *Trichuris trichiura*, para três indivíduos (Tabelas 3 e 5).

Para os ancilostomatídeos foi possível comparar somente 202 amostras (Tabela 3) devido ao tempo transcorrido entre a preparação das lâminas e sua leitura. O método de Kato-Katz preconiza que para ancilostomatídeos as lâminas sejam lidas em até 2 horas (KATZ *et al.* 1972) após sua preparação, o que nem sempre foi possível. As próprias características dos ovos desses parasitos que são translúcidos e frágeis, aumentam ainda

mais a dificuldade de diagnóstico pelo método de Kato-Katz. Após duas horas da preparação das lâminas, os ovos superclarificados não aparecem convenientemente e nos lugares ocupados por eles ficam áreas claras, sendo impossível identificá-los.

MELLO, ROCHA, MOREIRA, (2000) e MANGINI *et al.* (1999) não constataram diferenças significativas nos resultados entre Coprotest® e Kato-Katz para helmintos. MELLO *et al.* (2000) ao compararem 182 amostras de fezes não encontraram diferenças significativas para Coprotest® e Kato-Katz entre os helmintos. Esses mesmos autores realizaram o método de Coprotest® de acordo com as instruções do fabricante (NL Comércio Exterior – Divisão Diagnostek). MANGINI *et al.* (1999), ao estudarem 114 amostras de fezes, observaram que a taxa de prevalência para *Trichuris trichiura* foi significativamente menor para o método de Coprotest® (24,6%) em relação aos métodos de Lutz (sedimentação espontânea), direto e Kato-Katz (43%). Com o objetivo de se alcançar melhores resultados, esses autores efetuaram pequenas modificações na técnica preconizada pelo fabricante do Coprotest® e 128 amostras de fezes foram submetidas ao mesmo estudo comparativo. As modificações no Coprotest® foram as seguintes: a agitação dos tubos com acetato de etila foi feita manual e individualmente, ao contrário da instrução que preconiza agitação em estante; a centrifugação foi realizada a 1500 rpm por 2 minutos e não a 2000 rpm por 2 minutos. A segunda centrifugação foi substituída por sedimentação espontânea durante 1 hora ou mais. Após as modificações efetuadas na preparação do exame parasitológico de fezes pelo método de Coprotest®, MANGINI *et al.* (1999) puderam observar uma sensível melhora nos resultados da leitura microscópica e obtiveram para *Trichuris trichiura* 18% no Coprotest® e 22,7% nos métodos de Lutz, direto e Kato-Katz. MELLO *et al.* (1989) não observaram nenhuma diferença significativa para helmintos em 76 exames parasitológicos de fezes entre os métodos Coprotest® (técnica preconizada pelo fabricante) (71,1%) e Lutz (73,7%). Todavia, AMATO NETO *et al.* (1989) ao compararem 207 amostras de fezes pelos métodos Lutz, Faust, Rugai e Coprotest® (técnica preconizada pelo fabricante) puderam observar que o Coprotest® foi superior aos demais métodos quanto aos ovos de *Trichuris trichiura*, sendo 10,6% para Coprotest®, 7,2% para Faust e 3,4 % para Lutz.

Nos trabalhos de MELLO *et al.* (1989), AMATO NETO *et al.* (1989), MANGINI *et al.* (1999) e MELLO *et al.* (2000) os autores fizeram uma comparação dos métodos Coprotest®, Kato-Katz, Lutz, Faust e Rugai, observando apenas as frequências dos parasitos entre os mesmos, não sendo calculadas sensibilidade, especificidade, coeficiente Kappa e carga parasitária.

No nosso trabalho consideramos interessante modificar a técnica do Coprotest® em apenas um aspecto. A agitação dos tubos com acetato de etila foi manual e individual, a fim de se obter uma melhor homogeneização do material.

Constatamos uma diferença significativa na taxa de infecção para *Trichuris trichiura* pelos métodos de Kato-Katz (16,2%) e Coprotest® (7,5%) (Tabela 3). Com relação às medidas de exatidão entre os dois métodos (Tabela 4), obteve-se um Kappa intermediário de 0,54. Ao analisarmos a intensidade de infecção (Tabela 5) foi verificado para *Trichuris trichiura* que quando o método de Coprotest® foi negativo e Kato-Katz positivo, a média geométrica do número de ovos por grama de fezes para o método Kato-Katz foi menor (65 opg) e quando ambos foram positivos, a média geométrica de ovos por grama de fezes para o método Kato-Katz foi maior (199 opg). O nível de carga parasitária entre ambos foi leve (até 5.000 opg) segundo REY (1991). Quando a carga parasitária para o método de Kato-Katz foi baixa, o método de Coprotest® foi negativo (Tabela 5).

As cargas parasitárias das infecções por helmintos foram de uma maneira geral classificadas como leves (Tabela 6). Todavia, constatou-se intensidade intensa (mais de 10.000 ovos por grama de fezes) (Quadro1) para *Ascaris lumbricoides* em 49% dos indivíduos examinados. Esta carga parasitária e o índice de prevalência de 34,4% (Tabela 1) indicam que este geohelminto merece destaque no programa de saúde comunitária do município de Pedro de Toledo – SP.

Deve-se ter a precaução ao se analisar o baixo Kappa, 0,39 (Tabela 4) para *Schistosoma mansoni*, uma vez que foram constatados apenas 7 indivíduos infectados pelo método de Kato-Katz e 3 pelo método de Coprotest® (Tabelas 1 e 3).

Além da carga parasitária ser limitante no uso do Coprotest®, outros aspectos merecem ser discutidos. Apesar do uso de aproximadamente 140 mg de fezes para o método de Coprotest® e 129 mg de fezes para o método de Kato-Katz (43 mg por lâmina), este último mostrou-se mais sensível. No método de Kato-Katz as fezes são clarificadas sem qualquer diluição, enquanto no método de Coprotest®, embora a quantidade de material seja um pouco maior, provavelmente perde-se parte do material e de formas parasitárias durante seu processamento nas seguintes etapas: na diluição com formol a 10% em que se utiliza parte do material diluído (7 ml); o uso do acetato de etila como desengordurante também favorece a perda do material fecal, visto que há a formação de uma camada sobrenadante de $\pm 0,5$ cm de espessura, composta de restos fecais misturados com detritos de gordura que é sempre desprezada. O método de Coprotest® utiliza fezes consistentes, pastosas, semi-pastosas e até mesmo líquidas. Neste último caso, o material fecal já estaria diluído naturalmente. Dependendo dessa consistência, pode haver maior ou menor quantidade de detritos, como restos alimentares, algumas vezes mal digeridos como fibras vegetais, fibras musculares, amido em dimensões macroscópicas, dificultando a passagem das fezes propriamente ditas pela peneira. No método de Kato-Katz, esses resíduos ficam retidos na tela metálica e só se utiliza para análise o material tamizado. A tela metálica tem um diâmetro ($250\mu\text{m}$), que permite a passagem de resíduos e ovos de helmintos. Portanto, a seleção e concentração do material independe da pressão exercida pelo analista sobre a tela durante o procedimento da técnica. No presente estudo, evitamos o uso de fezes diarréicas e mucosas, sendo analisadas apenas fezes formadas. DOMINGUES *et al.*(1980) obtiveram uma maior concentração e homogeneização no método de Kato-Katz, quando evitaram também alguns fatores que para eles levariam a resultados imprecisos, como por exemplo, fezes diarréicas, muco e resíduos. Portanto, quando estes interferentes são evitados, permite-se ao método, uma melhor homogeneidade, assim como uma maior concentração. Seria interessante realizar estudo comparativo entre Kato-Katz e Coprotest®, aplicando os mesmos critérios de recusa de amostra para ambos os métodos.

ARAÚJO (2000) padronizou uma metodologia que permitiu a quantificação de ovos de helmintos por meio do método de Coprotest® a avaliação da sua aplicabilidade em estudos epidemiológicos. Nas amostras vindas do campo, processadas pelo Coprotest®, a

metodologia de quantificação por amostragem foi aplicada naquele material que continha acima de 5.000 ovos de *Ascaris lumbricoides* por grama de fezes, correspondendo a aproximadamente 200 ovos por lâmina, segundo método de Kato-Katz. Esse limite foi definido ao se observar durante a leitura para diagnóstico qualitativo das fezes que, pelo menos um ovo está presente em cada campo examinado ao microscópio, com aumento de 100x. Quando se aplicou essa metodologia de quantificação por amostragem nas lâminas preparadas por meio do método de Kato-Katz, observou-se que os ovos ficavam menos espalhados na lâmina. O esfregaço fecal, preparado com aproximadamente 22mm de diâmetro, apresentava área menor do que a lamínula de vidro utilizada no Coprotest® (24x32mm), o que propicia a maior proximidade entre os ovos. Assim, foi possível realizar a quantificação por amostragem nas lâminas de Kato-Katz que apresentavam número de ovos por grama de fezes à partir de 2.500, correspondendo a cerca de 100 ovos por lâmina. Comparando-se os resultados qualitativos do Coprotest® com os obtidos pelo método de Kato-Katz, ARAÚJO (2000) observou uma boa concordância para *Schistosoma mansoni*, *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*. Quando o número de ovos por grama de fezes foi abaixo de 100, o Coprotest quantitativo foi inferior ao Kato-Katz. Essa limitação dos dois métodos em detectar ovos em amostras de indivíduos com baixa carga parasitária pode levar a uma determinação subestimada da prevalência das parasitoses. O mesmo ocorreu no presente trabalho, pois quando as amostras foram positivas no Kato-Katz para *Trichuris trichiura* e ancilostomatídeos e negativas para o método de Coprotest®, a carga parasitária detectada no método de Kato-Katz foi mais baixa, 65,0 opg para *Trichuris trichiura* e 13,6 opg para ancilostomatídeos. Por outro lado, quando ambos os métodos foram positivos, a carga parasitária foi maior, 199,0 opg para *Trichuris trichiura* e 65,5 opg para ancilostomatídeos.

KATZ, COELHO, PELLEGRINO (1970) comparando a taxa de recuperação de ovos de *Schistosoma mansoni* adicionados a fezes humanas processadas por meio do método de Kato, com e sem tamização da matéria fecal, verificaram maior concentração de ovos no material tamizado. Observações semelhantes foram realizadas por KNIGHT *et al.* (1976) em amostras clínicas com diferentes cargas de ovos de *Schistosoma mansoni*, verificando que a média de ovos recuperados em fezes tamizadas foi 38% maior que no

material não tamizado. Sendo assim, é importante considerar esse aspecto ao se interpretar os resultados obtidos por meio do método de Kato-Katz.

É oportuno comentar a discordância entre os métodos Coprotest® e Lutz (Tabela 7) para os cistos de *Blastocystis hominis*. Isto provavelmente se deve a água utilizada na técnica de Lutz que destrói os cistos do protozoário (ZAMAN, HOWE, NG, 1995). Já o formol tamponado a 10% usado no Coprotest® preserva a sua morfologia e a salina (0,85%) usada no direto também não destrói os cistos. Como no método de Coprotest®, a água é usada somente no final do processamento para lavagem do material e já estando os cistos de *Blastocystis hominis* preservados pelo formol, os mesmos não são destruídos neste método. Assim, exames de fezes de rotina que não utilizam água em suas preparações são adequados para reconhecer e identificar *Blastocystis hominis* (ZAMAN *et al.* 1995).

Embora grande parte da população mundial possa albergar *Blastocystis hominis*, muitos indivíduos permanecem assintomáticos. *Blastocystis hominis* é muito mais prevalente do que outros protozoários intestinais patogênicos e não patogênicos. Ele pode apresentar-se em formas císticas e amebianas, sendo esta última ocasionalmente vista em fezes diarréicas e de difícil reconhecimento (ZIERDT, 1991). Podemos confundir *Blastocystis hominis* com leucócitos, leveduras, detritos ou com cistos de amebas. *Blastocystis hominis* pode ser quantificado quando encontrado nas fezes como raros, poucos, moderados ou muitos. O *Blastocystis hominis* deve ser quantificado somente no exame direto, pois o material fecal não pode ser concentrado.

Na ausência de outros organismos como parasitos, bactérias ou viroses, *Blastocystis hominis* pode ser a causa de diarréia, cólica, náusea, febre, vômito e dor abdominal e deve ser tratado (GIACOMETT *et al.* 1999). Tanto em grande como em pequena quantidades, ele pode ser causa de sintomatologia intestinal. O metronidazol aparece como a droga mais adequada (DUNN & BOREHAM, 1991). Em pacientes imunossuprimidos, os sintomas podem ser mais pronunciados. Em pacientes sintomáticos, nos quais nenhum agente etiológico foi identificado, *Blastocystis hominis* pode certamente ser considerado o possível patógeno (ALBRECHT *et al.* 1995).

Quanto aos demais parasitos diagnosticados nas amostras processadas, a frequência foi determinada somente por meio dos resultados obtidos no Coprotest® (Tabela 2). Vale ressaltar que alguns parasitos como *Strongyloides stercoralis*, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* e *Blastocystis hominis*, não detectados pelo método de Kato-Katz, deixariam de ser diagnosticados na população, não fosse a aplicação do Coprotest®.

Por ter sido o Coprotest® inferior ao Kato-Katz para detecção de *Trichuris trichiura*, não é aconselhável usá-lo como único método de concentração em uma rotina laboratorial, quando as cargas parasitárias são baixas. Atualmente, na região sudeste do Brasil, geralmente as populações apresentam intensidades de infecção leves (NEVES *et al.* 2001).

Para comparação dos métodos de Coprotest®, hematoxilina férrica, Lutz e o método enzimático (ELISA) (Tabela 8), usou-se a técnica de hematoxilina férrica como padrão, por ser esta técnica mais específica na detecção de protozoários intestinais.

A frequência de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* foi de 47,7% nos métodos Coprotest® e Lutz e 50,0% na hematoxilina férrica e método enzimático (Tabela 7). A sensibilidade e especificidade para o método imunoenzimático foi de 100% (Tabela 9). Para comparação dos métodos utilizou-se propositalmente 86 amostras de pacientes com história clínica de amebíase intestinal. Se fosse utilizada amostragem sem suspeita clínica, certamente o número de indivíduos parasitados por *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, seria bastante reduzido, uma vez que na rotina laboratorial dos Hospitais de Clínicas, da UNICAMP e da USP (SP), a frequência para esses protozoários é, em média, inferior a 1%.

No presente trabalho não foi utilizado o método de flutuação em sulfato de zinco (Faust) para pesquisa de protozoários e ovos leves (principalmente ancilostomatídeos), pois com base no estudo de SALVARANI, MENDES, DIAS (2000) verificou-se que o método de Coprotest® era altamente satisfatório para detecção de protozoários intestinais. Esses autores ao examinarem 430 amostras de fezes, não

observaram discordância na comparação dos métodos de Lutz, Coprotest®, Faust e Willis, para a detecção de protozoários (*Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, *Entamoeba coli*, *Iodamoeba butschilli*, *Endolimax nana*, *Isospora belli*) e para ancilostomatídeos. Por outro lado, no Brasil, a rotina de exames de fezes geralmente está apoiada na técnica de Lutz e não na de Faust, a mais adequada para o diagnóstico de protozoários intestinais, excetuando-se a hematoxilina férrica.

Os resultados das análises dos métodos Coprotest® e Lutz (Tabela 8) foram altamente concordantes tanto para protozoários como para helmintos, com exceção de *Blastocystis hominis* que não foi detectado no método de Lutz. SALVARANI *et al.* (2000) examinando 353 amostras de fezes obtiveram uma boa concordância (Kappa 0,82) entre as técnicas de Lutz e Coprotest® para detecção de helmintos e entre os protozoários houve discordância apenas para *Blastocystis hominis* (Kappa 0,33), da mesma forma que em nosso trabalho, onde o Kappa foi de 0,42 (Tabela 8).

Não constatamos discordância entre os métodos parasitológicos e o método imunoenzimático (ELISA) em relação a *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* (Tabela 7), observando um ótimo Kappa (0,97 para Coprotest® e Lutz e 1,00 para ELISA) (tabela 9). Todavia vários trabalhos demonstram discordância entre os métodos utilizados (ONG *et al.* 1996; BENZEGUIR & KETTIZ, 1997; PÓVOA *et al.* 2000).

ONG *et al.* (1996) ao compararem 431 pacientes detectaram mais casos de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* no método imunoenzimático (16,9%) do que nos métodos parasitológicos (direto e concentração pelo MIF, 10,9%). Todos os resultados positivos foram confirmados pela coloração com hematoxilina férrica. O método imunoenzimático apresentou sensibilidade e especificidade de 78% e 99%, respectivamente. BENZEGUIR & KETTIZ (1997) examinando 200 amostras fecais, sendo que 8% (N= 40) eram de indivíduos sintomáticos para amebíase intestinal, detectaram 26 (13%) amostras positivas para *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* utilizando a técnica de Ritchie, direto e coloração de azul de metileno e 41 amostras (20,5%) positivas para os mesmos protozoários pelo método enzimático. O método imunoenzimático apresentou sensibilidade e especificidade de 100% e 99,3% respectivamente; pelas técnicas

parasitológicas a sensibilidade foi de 65% e especificidade de 100%. POVOA *et al.* (2000) ao analisarem 438 amostras fecais, obtiveram uma porcentagem de 10,5% para *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* para os métodos direto e Faust, 8,0% para hematoxilina férrica e 29% para o método imunoenzimático. Segundo esses autores, o teste de coproantígenos foi mais eficiente para detecção da amebíase intestinal, com maior sensibilidade (86%) e especificidade (98%) do que os métodos parasitológicos. Nos trabalhos acima mencionados, os autores encontraram discordância entre os métodos imunológico e parasitológicos, indicando que o primeiro foi mais eficiente.

Com os resultados obtidos no nosso trabalho, questiona-se as afirmações de ONG *et al.* (1996); BENZEGUIR & KETTIZ (1997) e POVOA *et al.* (2000), pois nossos resultados foram compatíveis em todos os métodos (Coprotest®, Lutz, hematoxilina férrica e imunoenzimático) (Tabela 7). Atribuímos a nossa concordância aos seguintes fatores: cuidado na execução das técnicas, experiência do laboratorista e morfometria dos protozoários. Quando esses fatores não são considerados, a diferenciação morfológica com outras amebas intestinais, leucócitos e artefatos é prejudicada, podendo levar a erros no diagnóstico microscópico (BRUCKNER, 1992). O método parasitológico é baseado nas características físicas, mecânicas e biológicas dos estágios parasitários encontrados no organismo do hospedeiro. Portanto, é imprescindível que o método de escolha seja o mais adequado para pesquisa do parasita em questão. As amebas devem ser diferenciadas pelas suas características morfológicas, morfométricas e número de núcleos; por isso, é importante o uso de colorações permanentes e a morfometria dos parasitos. Em um exame à fresco, células do sangue, tais como, leucócitos e macrófagos contendo vacúolos ou até mesmo eritrócitos, podem ser confundidos com trofozoítas de amebas, levando a erros de diagnóstico. Daí a necessidade de se usar uma coloração permanente para garantia de um diagnóstico seguro.

A coloração permanente de hematoxilina férrica ainda é a mais usada por ser considerada o melhor processo de coloração para trofozoítas e cistos de amebas permitindo um diagnóstico seguro e o uso concomitante com a morfometria nos permite fazer a diferenciação entre as mesmas.

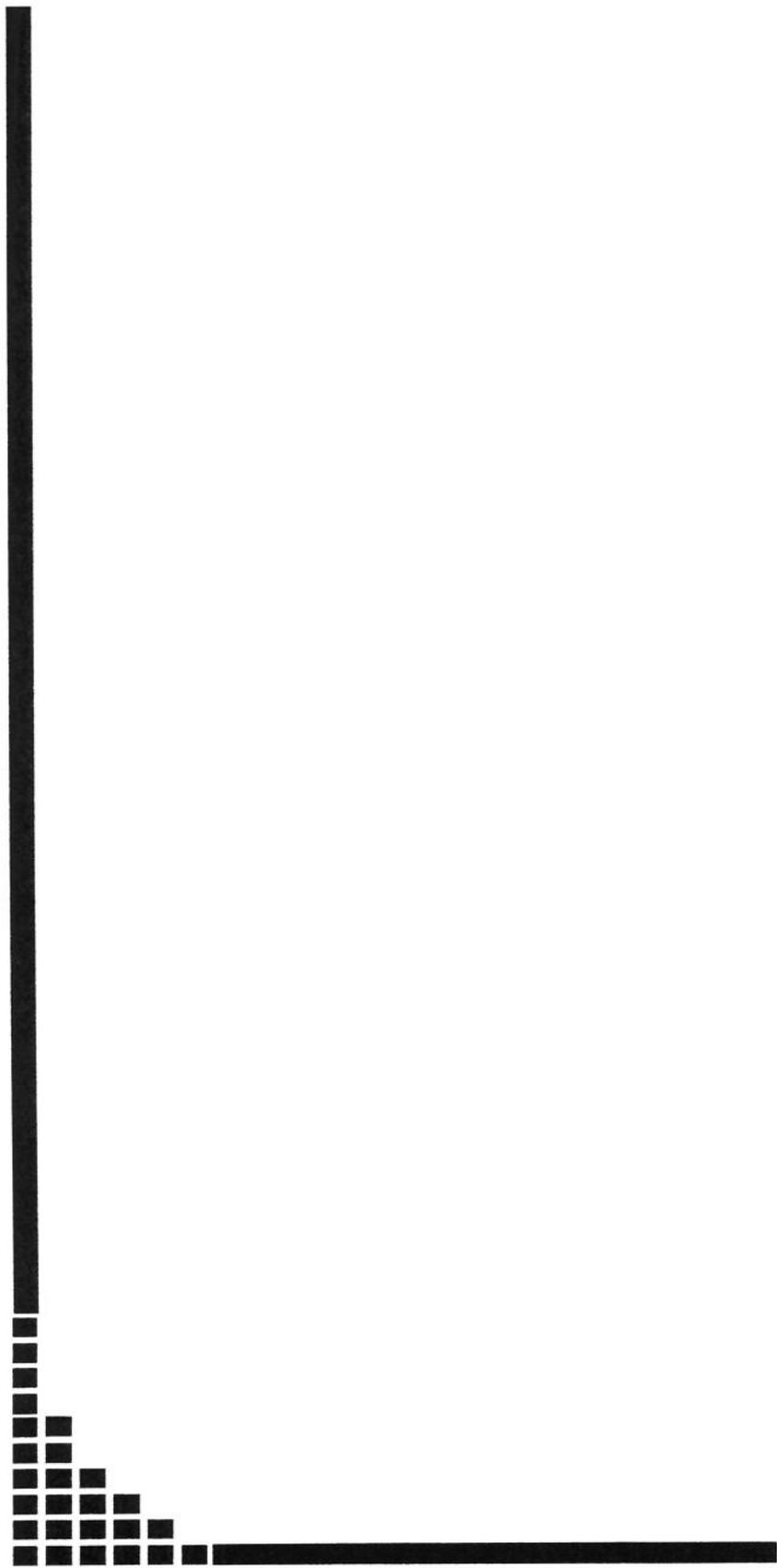
Atualmente, métodos de detecção de antígenos nas fezes tornaram-se uma opção para os laboratórios de Patologia Clínica nos casos em que as técnicas parasitológicas tradicionais são insatisfatórias. Vários “kits” estão disponíveis comercialmente e a especificidade e sensibilidade deles proporcionam excelentes resultados (HAQUE, *et.al.* 1995; WILSON *et al.* 1995). Estes “kits” que utilizam o ELISA determinam a presença de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, diferenciando-as de outras amebas não patogênicas como *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Iodamoeba butschilli*, *Endolimax nana*. Também existe “kit” que pode separar *Entamoeba histolytica* da *Entamoeba dispar*, usando a reação de ELISA ou reação de polimerase em cadeia (PCR) (BRITTEN *et al.* 1997; MIRELMAN *et al.* 1997; ZENGZHU *et al.* 1999). Na diferenciação dessas duas amebas o PCR é mais sensível que o ELISA (BRITTEN *et al.* 1997; SANUKI *et al.* 1997; TROLL *et al.* 1997). Todavia existem autores que não encontram diferença entre PCR e ELISA (HAQUE *et al.* 1998). Os métodos comerciais que empregam a metodologia enzimática requerem fezes refrigeradas até 48 horas ou congeladas. O PCR mostrou-se muito mais sensível com fezes sem conservantes, mantidas apenas refrigeradas por período de até 30 dias. O uso do conservante SAF em fezes armazenadas pelo mesmo período, diminui fortemente a sensibilidade do PCR (TROLL *et al.* 1997). Os autores revelam que o uso do fixador SAF durante apenas o procedimento de concentração não interfere no resultado final do PCR.

É importante lembrar que a técnica de PCR por amostras de DNA, tem demonstrado bons resultados na diferenciação entre *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* (HAQUE *et al.* 1995; BRITTEN *et al.* 1997; TROLL *et al.* 1997; HAQUE *et al.* 1998; GOMES *et al.* 1999). Essa técnica que permite a diferenciação entre as amebas, auxilia o médico quanto ao uso ou não de medicação antiparasitária específica.

O teste ELISA usado em nosso trabalho foi o ProSpect Ensaio Imunoenzimático (Alexon®, Inc) para *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* em microplaca. É um teste simples, de fácil execução, com sensibilidade e especificidade de 100%, podendo ser incluído como método de diagnóstico nos casos suspeitos de amebíase intestinal, embora o seu alto custo e o fato de não diferenciar cepas patogênicas (*Entamoeba histolytica*) das não patogênicas (*Entamoeba dispar*) seriam fatores limitantes

para o uso na rotina em Patologia Clínica. Além disso, as amostras de fezes devem ser coletadas em frascos de plástico limpo e armazenadas de 2 a 8°C e testadas dentro de 48 horas. Se as amostras não puderem ser processadas dentro de 48 horas, deverão ser congeladas a -20°C. Amostras de fezes concentradas ou coletadas em formalina 10%, fixadores SAF ou APV não são adequadas para realização deste ensaio (RAMOS *et al.* 1999).

Nossos resultados indicam que a pesquisa de antígenos nas fezes (ELISA) não obteve resultados superiores aos métodos de Lutz, Coprotest® e hematoxilina férrica. O Coprotest® não deve ser usado como único método de concentração quando as cargas parasitárias de helmintos são baixas.



6. CONCLUSÕES

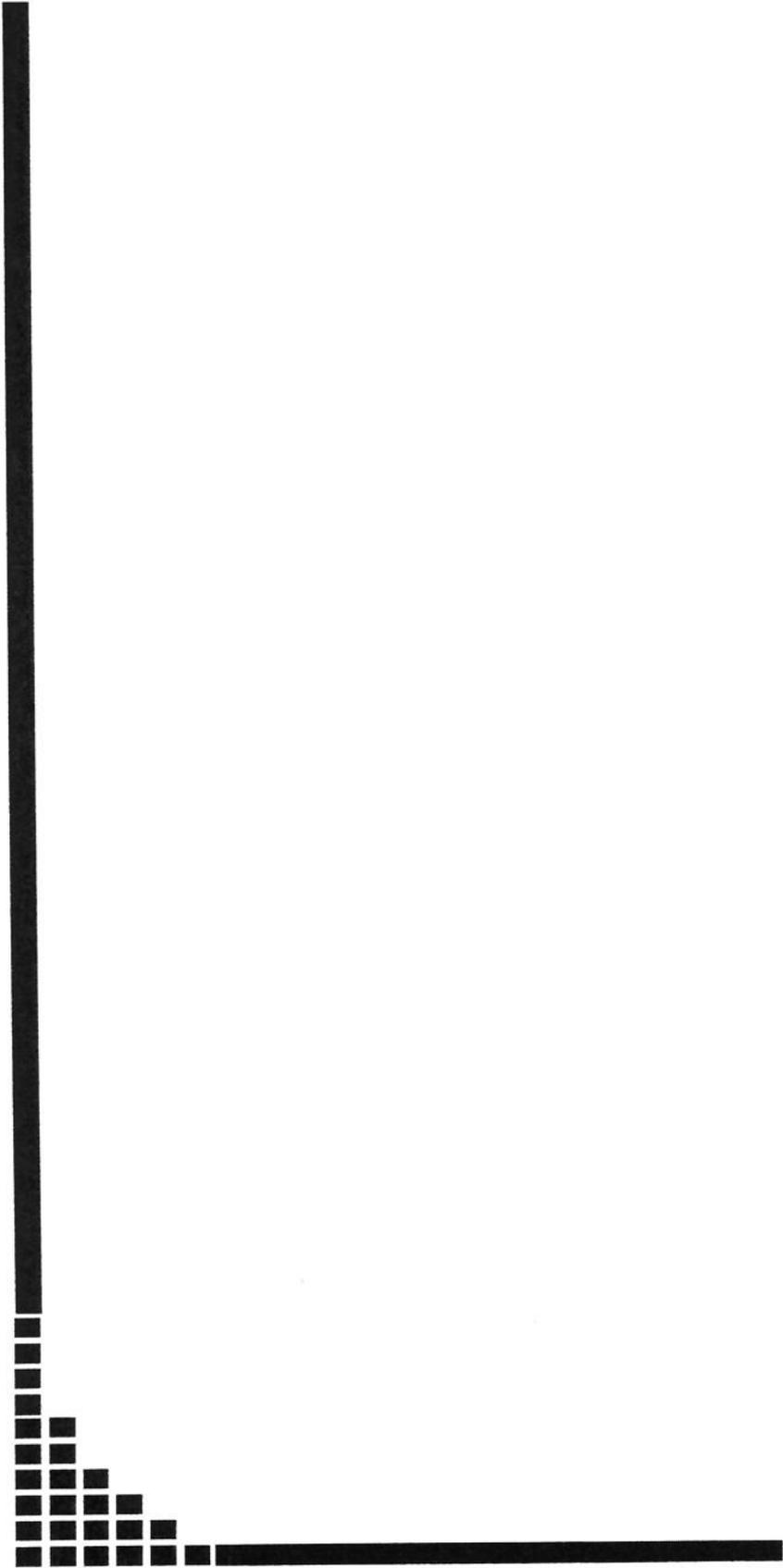
O Coprotest® mostrou-se inferior ao método de Kato-Katz na detecção de ovos de *Trichuris trichiura* e ancilostomatídeo quando a intensidade de infecção é baixa. Mesmo sendo um método de concentração, não é aconselhável usá-lo como única técnica em uma rotina laboratorial, na vigência de baixas cargas parasitárias.

O método de Kato-Katz apesar de utilizar uma quantidade menor de fezes em relação ao método de Coprotest®, concentra melhor o material fecal após a passagem das fezes pela tela metálica.

Tanto o método de Coprotest® como o método de Lutz foram altamente concordantes na detecção de protozoários. É desnecessário o uso concomitante dos dois métodos na rotina laboratorial, ficando a critério do laboratorista a escolha daquele que mais lhe convier.

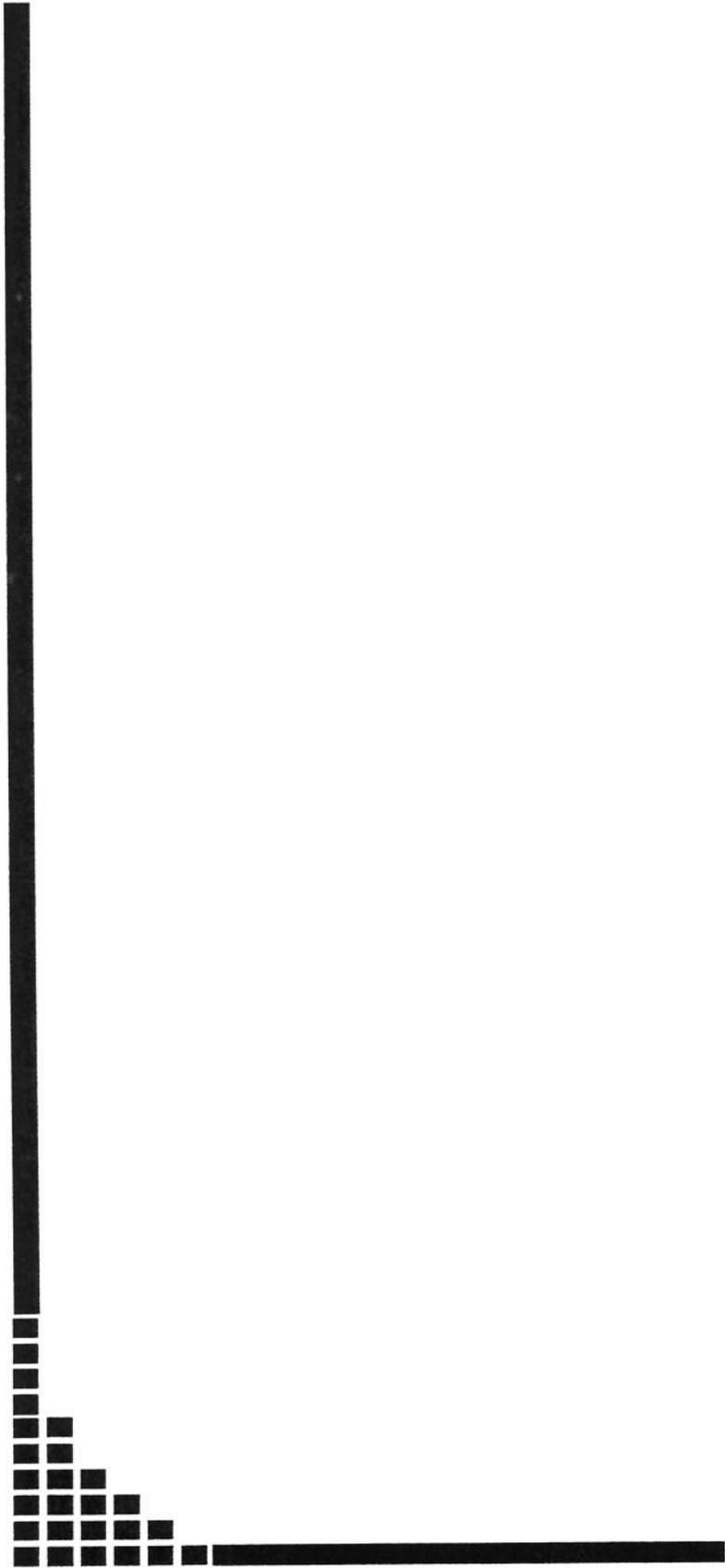
Não houve discordância entre os métodos parasitológicos Coprotest®, Lutz, hematoxilina férrica e ELISA (detecção de antígenos nas fezes). Tanto o ELISA como o método de coloração permanente pela hematoxilina férrica foram excelentes para detectar *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* nas fezes.

O teste de ELISA é simples, de fácil execução, com ótima sensibilidade e especificidade, mas por ser de alto custo, não poder usar fezes conservadas e o fato de não diferenciar *Entamoeba histolytica* da *Entamoeba dispar* pode levar a fatores limitantes para seu uso em uma rotina laboratorial.



7. SUMMARY

Parasitological diagnosis requires a high degree of sensitivity and specificity to detect intestinal parasites because the right treatment depends on this result. A comparative study was conducted on 332 individuals in the municipality of Pedro de Toledo, SP, Brazil, to assess the concordance between the Kato-Katz and Coprotest® techniques for helminths detection as well as the concordance regarding the Coprotest®, Lutz, iron hematoxylin and ELISA (antigens in the feces) techniques for protozoa diagnosis in 86 patients with a history of intestinal amebiasis. The comparison of Kato-Katz with Coprotest® in 332 samples demonstrated a significant difference in relation to *Trichuris trichiura*, 16.2% Kato-Katz and 7.5% Coprotest®. The positive and negative samples of the Coprotest® method were compared with the number of eggs per gram of feces (epg) obtained in the Kato-Katz method because of this difference. When the Coprotest® method was negative, the epg was 65 in the Kato-Katz method and when Coprotest® method was positive, the epg was higher (199). The Coprotest® method demonstrated that it was inferior to the Kato-Katz when the intensity of infection was low. No significant difference was observed regarding *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* with the Lutz, Coprotest®, iron hematoxylin and ELISA methods while the Kappa was higher at 0.97 indicating an optimum concordance among the methods.



***8. REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- ALBRECHT, H.; STELLBRINK, H.J.; KOPERSKI, K.; GRETEN, H. *Blastocystis hominis* in human immunodeficiency virus-related diarrhea. **Scand. J. Gastroenterol.**, **302**: 909-14, 1995.
- ALBONICO, M.; SMITH, P.G.; ERCOLE, E.; HALL, A.; CHWAYA, H.M.; ALAWI, K.S.; SAVIOLI, L. Rate of reinfection with intestinal nematodes after treatment of children with mebendazole or albendazole in a highly endemic area. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, **89**: 538-41, 1995.
- AMATO NETO, V.; CAMPOS, R.; PINTO, P.L.S.; MATSUBARA, L.; BRAZ, L.M.A.; MIYAMOTO, A.; FOSTER, R.; NASCIMENTO, S.A.B.; SOUZA, H.B.W.T.; MOREIRA, A. A. B. Avaliação da utilidade do “Coprotest” para exame parasitológico das fezes. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ.São Paulo**, **44**(4): 153-5, 1989.
- ARAÚJO, A.J.U.S. **Utilização do Método de Concentração em Formol-Acetato de Etila na Quantificação de Ovos de Helminhos e Avaliação de sua Aplicabilidade em Inquéritos Epidemiológicos.** São Paulo, 2000. 57pp. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).
- BENZEGUIR, A. K.& KETTIS, A.A. Evaluation of an Enzyme-Immunoassay Test Kit for Diagnostic Infections with *Entamoeba histolytica*. **Archives of Medical Research**, **28** (suppl): S276-8, 1997.
- BRITTEN, D.; WILSON, S.M.; MCNERNEY, R.; MOODY, A. H. CHIODINI, P.L.; ACKERS, J.P. An improved colorimetric PCR-Based Method for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in feces. **J. Clin. Microbiol.**, **35**(5): 1108-11, 1997.
- BRUCKNER, A. D. Amebiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, **5**(4): . 356-69, 1992.
- BURROWS; R.B. **Microscopic Diagnosis of the Parasites of Man.** Yale University Press. New Have and London, 1965.

- CARTRIGHT, C.P. Utility of multiple-stool-specimen ova and parasite examinations in a high-prevalence setting. **J. Clin. Microbiol.**, 37(8):2408-11, 1999.
- CHAN, M. S. The global burden of intestinal nematode infections. Fifty years on. **Parasitol. Today**, 13(11): 438-43, 1997.
- CERQUEIRA, F.L. Coprotest: metodologia confiável para o exame parasitológico de fezes. **Laes**. 9(51): 5,9,12, 1988.
- CIRMEMAN, B. & CIRMEMAN, S. **Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais**. São Paulo, Editora Atheneu, 1999. 375p.
- COSTA-CRUZ, J.M.; FERREIRA, M.S.; ROSSIN, I.R. Intestinal parasites in AIDS and HIV patients in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 91(6): 685-6, 1996.
- COURA, J.R. & CONCEIÇÃO, M.J. Estudo Comparativo dos métodos de Lutz, Kato e Simões Barbosa no diagnóstico da Esquistossomose mansoni. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 8 (3): 153-8, 1974.
- DEAN, A.G.; DEAN, J.A.COULOMBIER, D.; BRENDEL, K.A.; SMITH, D.C.; BURTON, A.H.; DICKER, R.C.; SULLIVAN, K.M.; FARGAN, R.F.; ARNER, T.G. **Epi Info, version 6.a Word processing database, and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers**. C. D. C., Atlanta, Georgia, U.S.A., 1995.
- DE CARLI, G.A. **Parasitologia Clínica – Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas**. 2a ed. São Paulo, Editora Atheneu, 2001. 810p.
- DIAS, L.C.S.; MANGINI, A.C.S.; TEIXEIRA, A.T.L. S.; DIAS, R.M.D.S. Total Test e métodos usados no exame de fezes: um estudo comparativo. **Rev. Bras. Pat. Clin.**, 29(2): 98, 1997.

- DOMINGUES, L.; SILVEIRA, M.; VANDERLEI, M.I.; KELNER, S. Possíveis fatores que alteram os resultados da coproscopia quantitativa de ovos de *S. mansoni* pelo método de Kato-Katz. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 22(3): p. 114-7, 1980.
- DUNN, L.A & BOREHAM, P.F.L. The in-vitro activity of drugs against *Blastocystis hominis*. **J. Antimicrob, chemother.**, 27: 507-16, 1991.
- FAUST, E.C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C.; LINCICOME, D. R. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminthes in feces. **J. Parasitol**, 25: 241-62, 1939.
- FERREIRA, M.S.& BORGES, A.S. Parasitoses oportunistas. **Rev. Pat. Trop.**, 25(2): 187-201, 1996.
- FERREIRA, M. S. Estrongiloidíase. In. VERONESI R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997. p. 856-65
- FERREIRA, A.W.& ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto Imunes**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001. 443p.
- FLEISS, J. L. **Statistical Methods for Rates and Proportions**. New York. JHON W. & SONS, 2. ed., 1981.
- GARCIA, L.S. **Diagnostic Medical Parasitology**. 4.ed. ASM Press, Washington, D. C. 2001. 1092p.
- GIACOMETTI, A.; CIRIONI, O.; FIORENTINI, A.; FORTUNA, M.; SCALISE, G. Irritable bowel syndrome in patients with *Blastocystis hominis* infection. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 18: 436-9, 1999.
- GOMES, M.A.; PESQUERO, J.B.; FURST, C.; VALLE, P.R.; PESQUERO, J.L.; SILVA, E. F. And improved method to distinguish *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. **Parasitology**, 119: 359-62, 1999.

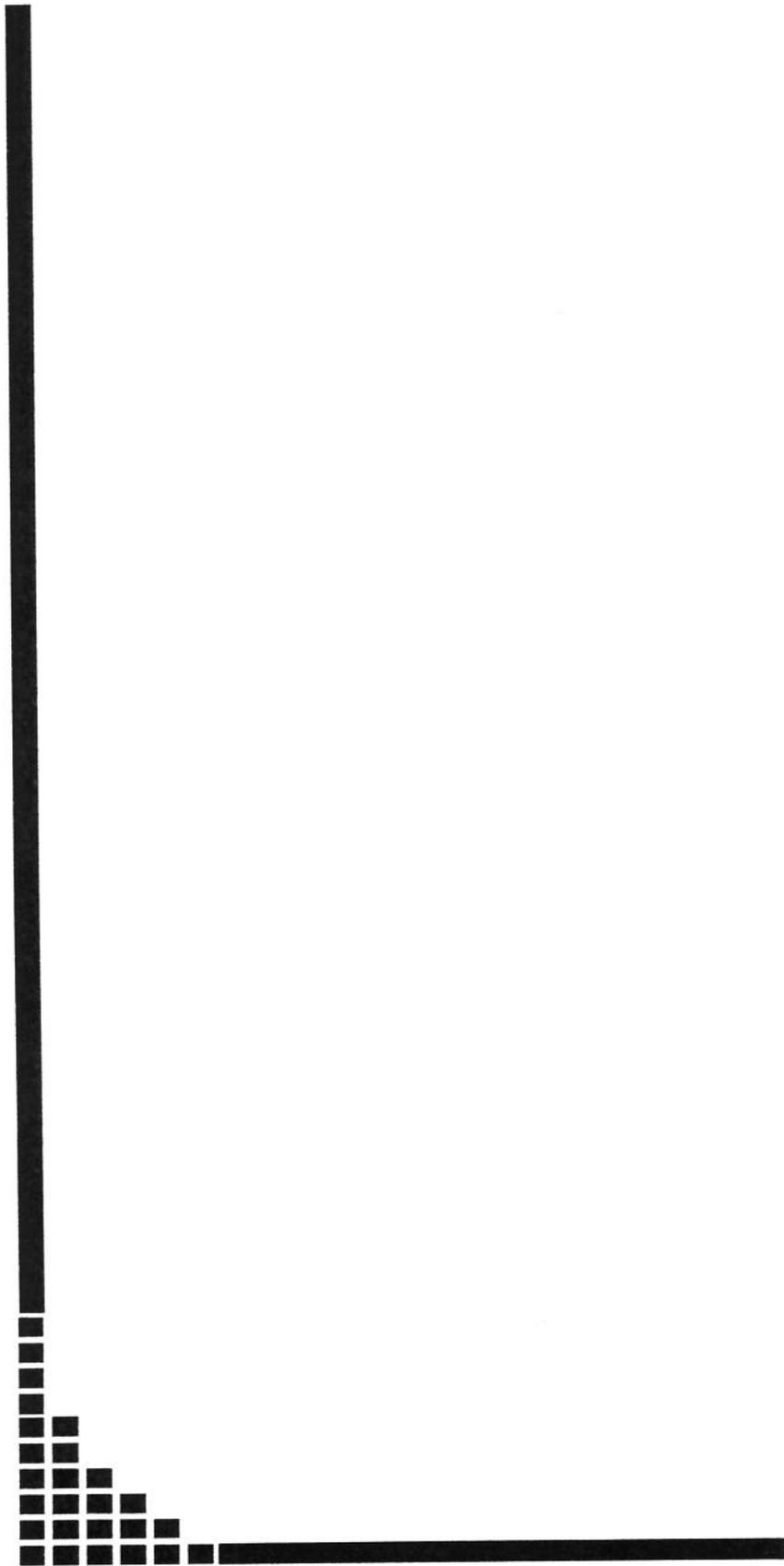
- GUIMARÃES , S. & SOGAYAR, M.I.L. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo state Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **37**(6): 501-6, 1995.
- HALL, A. Intestinal helminths of man: the interpretation of egg counts. **Parasitology**, **85**: 605-13, 1982.
- HAQUE, R.; NEVILLE, L.M.; HAHN, P.; PETRI JR, W.A. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. **J. Clin. Microbiol.**, **33**(10): 2558-61, 1995.
- HAQUE, R.; ALI, I.K.M.; AKTHER, S.; PETRI JR, W.A. Comparison of PCR, isoenzyme analysis and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. **J. Clin. Microbiol.**, **36**(2): 449-52, 1998.
- HENRIKSEN, S. & POHLENZ, J. Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Vet. Scand.**, **22**: 594-6, 1981.
- HOFFMAN, W.A.; PONS, J.A.; JANER, J.L. The sedimentation-concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. **Puerto Rico J. Publ. Helth** , **9**: 281-98, 1934.
- ISENBERG, H.D. **Essential Procedures for clinical Microbiol.** American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1995.
- KATZ, N.; COELHO, P.M.Z.; PELLEGRINO, J. Evaluation of Kato's Quantitative Method Through the Recovery of *Schistosoma mansoni* Eggs Added to Human Feces. **J. Parasitology**, **56**(5): 1032-3, 1970.
- KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **14**(6): 397-400, 1972.
- KNIGHT, W.B.; HIATT, R.A.; CLINE, B.L.; RITCHIE, L.S. A modification of the formol-ether concentration technique for increased sensitivity in detecting *Schistosoma mansoni* eggs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **25**(6): 818-23, 1976.

- LUTZ, A. O. *Schistosomum mansoni* e s Schistosomose segundo observações feitas no Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **11**: 121-55, 1919.
- MACHADO, M.T.; MACHADO, T.M.; YOSHIKAE, R.M.; SCHMIDT, A.L. A.; FARIA, R.C.A.; PASCHOALOTTI, M.A.; BARATA, R.C.B.:CHIEFFI, P.P. Ascariasis in the subdistrict of Cavacos, munipality of Alterosa (MG), Brazil: effect of mass treatment with albendazole on the intensity of infection. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **38**(4): 265-71, 1996.
- MACHADO, R.L.D.; FIGUEIREDO, M.C.; FRADE, A.F.; KUDÓ, M.E.; FILHO, M.G.S.; POVOA, M.M. Comparação de quatro métodos laboratoriais para diagnóstico da *Giardia lamblia* em fezes de crianças residentes em Belém, Pará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **34**(1): 91-3, 2001
- MAIPANICH, W.; PUBAMPEN, S.; SANGUANKIAT, S.; NONTASUT, P. ; WAIKAGUL, J. Effect of albendazole and mebendazole on soil-transmitted helminth eggs. **J. Trop. Med. Public. Health.**, **28**(2): 321-5, 1997.
- MANGINI, A.C.S.; QUADROS, C.M.S.; ZUBA, I.P.R.; FERREIRA, S.C.; FLORIANO, L.D.; BOZZOLI, L.M.; TORRES, D.M.A.G.V. Avaliação do kit Totaltest comparado com as técnicas de sedimentação espontânea, Rugai e Kato-Katz, no exame parasitológico de fezes. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, **31**(1): 29-31, 1999.
- MARTIN, L.K. & BEAVER, P.C. Evaluation of Kato Thick-Smear Technique for quantitative diagnosis of helminth infections. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **17**(3): 382-91, 1968.
- MELLO, R.T.; ROCHA, M.O.; COSTA, C.A.; GIOVANNINI, H.R.; MOREIRA, M.C.C.G. Estudo comparativo entre os métodos Coprotest e de Hoffman, Pons & Janner no diagnóstico de parasitoses intestinais. **Rev. Farm. Bioquim.**, **10**: 9-15, 1989.
- MELLO, R.T.; ROCHA, M.O.; MOREIRA, M.C.C.G. Exame parasitológico de fezes: estudo comparativo entre os métodos Coprotest, MIFC, Baermann e Kato. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, **32**(4): 289-91, 2000.

- MIRELMAN, D.; NUCHAMOWITZ, Y.; STOLARSKY, T. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR, amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *E. histolytica* and *E. dispar*. **J. Clin. Microbiol.**, **35**(9): 2405-7, 1997.
- MOURA, R.J. & SOUZA JUNIOR, J.A. Incidência de parasitose intestinal em escolares da rede municipal urbana de ensino de Juiz de Fora. **Rev. Bras. Med.**, **52**(4): 272-86, 1995.
- NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, M.P. **Parasitologia Humana**. 10ed. São Paulo, Editora Atheneu, 2001 428p.
- ONG, S J.; CHENG, M.Y.; LUI, K.H.; HORNG, C.B. Use of the Prospect® microplate enzyme immunoassay for the detection of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica* in faecal specimens. **Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.**, **90**: 248-9, 1996.
- PETRI JR, W.A.; CLARK, C.G.; DIAMOND, L.S. Host-parasite relationships in amebiasis: conference report. **J. Infect. Dis.**, **169**: 483-4, 1994.
- PÊSSOA, S.B.& MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**. 11ª ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S. A., 1982 872p.
- PIRES DE MATO, C.; AMATO NETO, V.; BRAZ, L.M.A.; CARIGNANI, F. L.; VILLELA, M.S.H.; PINTO, T.H.L.; DI PIETRO FERNANDES, A.O.; DE MARCHI CASADEI, R.M. *Blastocystis hominis*. Diagnóstico por exame direto e por coloração com tionina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **31**(supl. 1): 188, 1998.
- POVOA, M.M.; ARRUDA, J.E.G.; SILVA, M.C.C.; BICHARA, C.N.C.; ESTEVES, P.; GABBAY, Y.B.; MACHADO, R.L.D. Diagnóstico de amebíase intestinal utilizando métodos coproscópicos e imunológicos em amostra da população da área metropolitana de Belém – Pará- Brasil. **Cad. Saúde Pública**, **16**(3): 843-6, 2000.
- RAMOS, F.; ZURABIAN, R.; MORAN, P.; RAMIRO, M.; GOMEZ, A.; CLARK, C.G.; MELENDRO, E.I.; GARCIA, G.; XIMENEZ, C. The effect of formalin fixation on the polymerase chain reaction characterization of *Entamoeba histolytica*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **93**: 335-6, 1999.

- RAVDIN, J.T. Amebiasis. **Clin. Infect. Dis.**, **20** 1453-66, 1995.
- REED, S.L. – New concepts regarding the pathogenesis of amebiasis. **Clin. Infect, Dis.**, **21**(Suppl 2): S182- 5, 1995.
- REY L. **Parasitologia**. 2ª. ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., 1991 731 p.
- RITCHIE, L.S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. **Bull. U. S. Army Med. Dept.**, **8**; 326, 1948.
- SALVARANI, J.J.; MENDES, C.R.; DIAS, L.C.S. Avaliação de técnicas parasitológicas no diagnóstico laboratorial de parasitos intestinais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA CLÍNICA E MEDICINA LABORATORIAL, 3, Florianópolis, 2000. **Temas Livres**. Florianópolis, 2000. p. 29 (Resumo, 35).
- SAMPAIO TEIXEIRA, A.T.L. ; GARLIPP, C.R.; BOTTINI, P.V.; MENDES, C.R. Importância do Diagnóstico Laboratorial da Criptosporidíose Humana. **Rev. Bras. Pat. Clin.**, **28**: 105, 1992.
- SANUKI, J.; ASAI, T.; OKUZAWA, E.; KOBAYASHI, S.; TAKEUCHI, T. Identification of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* cysts in stool by polymerase chain reaction. **Parasitol. Res.**, **83**: 96-8, 1997.
- STENZEL, D.J. & BOREHAM, P.F. *Blastocystis hominis* revisited. **Clin. Microbiol. Rev.**,**9**(4): 563-84, 1996.
- TIJSEN, P. **Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology**. BURDON, R.H., VAN KEPPENBORG. Eds. New York, Elsevier, 1985:14.
- TROLL, H.; MARTI, H.; WEISS, N. Simple differential detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fresh stool specimens by Sodium Acetate-Acetic Acid- Formalin concentration and PCR. **J. Clin. Microbiol.**, **35**(7): 1701-5, 1997.

- UDKOW, M.P. & MARKELL, E.K. *Blastocystis hominis*: prevalence in asymptomatic versus symptomatic hosts. **J. Infect. Dis.** **168**: 242-4, 1993.
- WALSH, J.A. Problems in Recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. **Rev. Infect. Dis.**, **8(2)**: 228-37, 1986.
- WEISS, J.B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, **8(1)**: 113-30, 1995.
- WILSON, M.P.; SCHANTZ, P.; PIENIAZEK, N. Diagnosis of parasitic infections: immunologic and molecular methods. In MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER F.C.; YOLKEN R.H., ed. - **Manual of Clinical Microbiology**. 6a.ed. American Society for Microbiology. Washington, D. C., 1995. p.1159-70
- WHO – The control of *Schistosomiasis*. WHO Technical Report Series; 830 Geneva, 1993. 86 p.
- ZAMAN, V.; HOWE, J.; NG, .M. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* cystis. **Parasitol. Res.**, **81**: 465-9, 1995.
- ZENGZHU, G.; BRACHA, R.; NUCHAMOWITZ, Y.; CHENG-I, W.; MIRELMAN, D. Analysis by enzyme-linked immunosorbent assay and PCR of human liver abscess aspirates from Patients in China for *Entamoeba histolytica*. **J. Clin. Microbiol.**, **37(9)**: 3034-6, 1999.
- ZIERDT, C.H. *Blastocystis hominis* – past and future. **Clin. Microbiol. Rev.** **4(1)**: 61-79, 1991.



9. ANEXOS

CADASTRO DE PACIENTES

LOCAL <A>
 NOME <A >
 {MATRIC}ULA ##### IDADE ## SEXO <A>

METODOS

{HEMATOX}ILINA FERRICA <A>
 E.COLI1 <A> E.NANA1 <A> E.{HARTMA}NI{1} <A>
 E.{HISTO1}/DISPAR <A> IODA1 <A> BLASTO1 <A> GIARDIA1 <A>
 OUTROS1 <A > NAO {REAL}IZADOS{1} <A>

{LUTZ} <A>
 E.COLI2 <A> GIARDIA2 <A> HYMEN2 <A>
 E.NANA2 <A> STRONG2 <A> TENIA2 <A>
 E.{HARTM}ANI{2} <A> ANCY2 <A> ASCARIS2 <A>
 E.{HISTO2}/DISPAR <A> ENTERO2 <A> IODA2 <A>
 TRIC2 <A> BLASTO2 <A> SCHISTO2 <A>
 OUTROS2 <A > NAO {REAL}IZADOS{2} <A>

{COPROTEST} <A>
 E.COLI3 <A> GIARDIA3 <A> HYMEN3 <A>
 E.NANA3 <A> STRONG3 <A> TENIA3 <A>
 E.{HARTM}ANI{3} <A> ANCY3 <A> ASCARIS3 <A>
 E.{HISTO3}/DISPAR <A> ENTERO3 <A> IODA3 <A>
 TRIC3 <A> BLASTO3 <A> SCHISTO3 <A>
 OUTROS3 <A > NAO {REAL}IZADOS{3} <A>

IMUNO # NAO {REAL}IZADOS{4} <A>

□

CADASTRO DE PACIENTE

IDENTIFICACAO DA {UNICAMP} #### {DATA} DA {COLE}TA <dd/mm/yyyy>
IDENTIFICACAO DO {CAMPO} <A >
NOME <A > SEXO <A>
IDADE ## LOCAL <A >

KATO KATZ - {AMOSTRA1} <A>
S.{MANSONI1} <A> {OVOS} ##### ASC1 <A> {OVO}S #####
TRI1 <A> {OV}OS ##### ANCY1 <A> {OVO}S #####
TEN1 <A> OUTROS1 <A > NAO {REAL}IZADOS{1} <A>

COPROTEST - {AMOSTRA2} <A>
S.{MANSONI2} <A> ANCY2 <A> ASC2 <A>
ENT2 <A> TRI2 <A> HYM2 <A> TEN2 <A>
STRONG2 <A>
E.COLI <A> E.NANA <A> E.{HIST}/E.DISPAR <A>
IODA <A> GIAR <A> BLAST<A> OUTROS2 <A >
NAO {REAL}IZADOS{2} <A>

