

JULIANA BARBOZA DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DE UMA NOVA TÉCNICA (*TF-TEST MODIFIED*)
DESTINADA AO DIAGNÓSTICO DE PARASITOSEs INTESrINAIS
EM AMOSTRAS FECAIS**

**CAMPINAS, SP
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

JULIANA BARBOZA DE CARVALHO

“Avaliação de uma nova técnica (TF-Test Modified) destinada ao diagnóstico de parasitoses intestinais em amostras fecais.”

Este exemplar corresponde à redação final
da defendida pela candidata
**JULIANA BARBOZA DE
CARVALHO**
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Apresentada ao Instituto de Biologia da
UNICAMP para obtenção do Título de Mestra
em Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Jancarlo Ferreira Gomes
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Xavier Falcão

CAMPINAS,
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C253a Carvalho, Juliana Barboza, 1986-
Avaliação de uma nova técnica (*TF-Test Modified*) destinada ao diagnóstico de parasitoses intestinais em amostras fecais / Juliana Barboza de Carvalho. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Jancarlo Ferreira Gomes.
Coorientador: Alexandre Xavier Falcão.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *TF-Test Modified*. 2. Parasitologia – Métodos. 3. Intestinos – Parasitos. 4. Parasitologia médica – Diagnóstico. 5. Diagnóstico de laboratório. I. Gomes, Jancarlo Ferreira, 1960-. II. Falcão, Alexandre Xavier, 1966-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of a new technique (*TF-Test Modified*) intended for the diagnosis of intestinal parasites in fecal samples

Palavras-chave em inglês:

TF-Test Modified

Parasitology - Methods

Intestines - Parasites

Medical parasitology - Diagnosis

Laboratory diagnosis

Área de concentração: Parasitologia

Titulação: Mestra em Parasitologia

Banca examinadora:

Jancarlo Ferreira Gomes [Orientador]

Katia Denise Saraiva Bresciani

Marlene Tiduko Ueta

Data de defesa: 13-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia

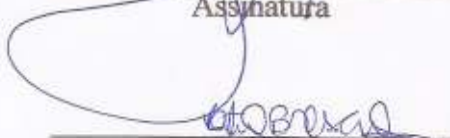
Campinas, 13 de agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jancarlo Ferreira Gomes (orientador)


Assinatura

Profª. Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani


Assinatura

Profª. Dra. Marlene Tiduko Ueta


Assinatura

Prof. Dr. Carlos Noriyuki Kaneto

Assinatura

Prof. Dr. Arício Xavier Linhares

Assinatura

Dedico este trabalho a todos que colaboraram direta e indiretamente para realização do mesmo e todos aqueles que acreditam que a ousadia e o erro são caminhos para grandes realizações.

AGRADECIMENTOS

À Deus: Jeova-Jireh pelo amparo e provisão em todos os momentos, por meio de sua infinita graça.

Aos orientadores Professores Dr. Jancarlo Ferreira Gomes e Dr. Alexandre Xavier Falcão, pelos ensinamentos, conceitos e apoio para realização da dissertação de mestrado.

À biomédica e amiga Bianca Martins dos Santos, pelo apoio incondicional no processamento das amostras; ao Mr. Celso Tetsuo Nagase Suzuki pelo auxílio em toda a pesquisa.

À equipe do setor de parasitologia do Laboratório Municipal de Patologia Clínica de Campinas/SP pelo acesso na obtenção dos dados.

À Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, em especial a Coordenadoria de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia pelo apoio irrestrito.

Às instituições Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e a empresa ImmunoCamp Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologia Ltda, pelo suporte financeiro da pesquisa.

Aos familiares, pela paciência, incentivo e companheirismo.

“Você nunca possuirá o que não estiver disposto a buscar.”
(Dr. Mike Murdock)

RESUMO

As parasitoses intestinais são altamente prevalentes no mundo, estando entre as maiores causadoras de doenças e óbitos em seres humanos. Atualmente, o diagnóstico laboratorial destas parasitoses é realizado por meio de procedimentos técnicos manuais, desenvolvidos na sua grande maioria há décadas, o que justifica a aplicabilidade de técnicas mais sensíveis e práticas para esta finalidade, visando obter resultados eficientes, especialmente em programas governamentais direcionados à Saúde Pública. Sendo assim, o objetivo do projeto foi de avaliar e validar uma nova técnica parasitológica, denominada *TF-Test Modified*, em comparação com três técnicas parasitológicas convencionais consagradas pela literatura: *TF-Test Conventional*; Rugai, Mattos e Brisola; e Kato-Katz/*Helm-Test*. As etapas do trabalho consistiram em realizar coleta de material fecal de 457 indivíduos localizados em regiões endêmicas para parasitoses no município de Campinas, SP; no processamento laboratorial de 1.828 exames; no diagnóstico de 14 espécies parasitárias; e na análise estatística qualitativa de resultados de maneira abrangente. Dentre as espécies parasitárias encontradas, helmintos e protozoários intestinais foram detectados em 42,23% de indivíduos pela técnica de *TF-Test Modified*, ante 36,76% por *TF-Test Conventional*, 5,03% por Kato-Katz/*Helm-Test*, e 4,16% por Rugai, Mattos e Brisola. Destes casos, 54,40% de infecção simples dos indivíduos demonstrou serem portadores de monoparasitismo. A nova técnica parasitológica de *TF-Test Modified*, quando comparada com as demais técnicas, apresentou alto valor de infecção, como exemplo para dupla, tripla e múltipla, de maneira a perfazer um total de 98,37% de infecções. Ademais, a nova técnica apresentou índice *Kappa* com grau de concordância *Quase Perfeito* em todos os parâmetros avaliados com estimativa de 95% ($P < 0,05$), permitiu encontrar com alta eficiência diagnóstica todas as espécies parasitárias estudadas, mostrou um notável diagnóstico verdadeiro, especialmente quando analisada comparativamente com as outras três técnicas convencionais. O atual estudo permitiu concluir que a técnica de *TF-Test Modified* pode ser utilizada de forma abrangente no diagnóstico qualitativo de protozoários e helmintos intestinais de humanos. O ganho de sensibilidade diagnóstica proporcionada por esta nova técnica deverá ser de estimável

contribuição para o diagnóstico individual laboratorial, inquéritos populacionais e controle das parasitoses intestinais, de modo a repercutir em contribuição social.

Palavras-chaves: *TF-Test Modified*; Parasitologia – Métodos; Intestinos – Parasitos; Parasitologia médica – Diagnóstico; Diagnóstico de laboratório.

ABSTRACT

Intestinal parasites are highly prevalent worldwide and is among the largest cause of illness and death in humans. Currently, the laboratory diagnosis of these parasites is accomplished through technical procedures manuals, developed mostly for decades, justifying the applicability of more sensitive techniques and practices for this purpose, to obtain effective results, especially in government programs aimed at Public Health. Thus, the objective of the project was to evaluate and validate a new technique parasite, called *TF-Test Modified*, compared with three conventional parasitological techniques enshrined in literature: *TF-Test Conventional*; Rugai, Mattos and Brisola, and Kato-Katz / *Helm-Test*. The steps of the work consisted of conducting a collection of fecal samples from 457 individuals located in regions endemic for parasitic infections in Campinas, SP, in laboratory processing of 1,828 examinations, the diagnosis of 14 parasitic species, and the qualitative statistical analysis of results so comprehensive. Among the species found parasitic, helminths and intestinal protozoa were detected in 42,23% of subjects using the technique of *TF-Test Modified*, against 36,76% by *TF-Test Conventional*, 5,03% by Kato-Katz/*Helm-Test*, and 4,16% Rugai, Mattos and Brisola. Of these cases, 54,40% of single infections of individuals were shown to be carriers of monoparasitism. The new technique parasitological *TF-Test Modified* compared to other techniques of infection showed a high value, for example double, triple and multiple so as to make a total of 98,37% infections . Moreover, the new technique presented *Kappa* index level of agreement with *Almost Perfect* in all parameters with estimated 95% ($P < 0.05$), allowed to meet with high diagnostic efficiency all parasitic species studied showed remarkable true diagnosis, especially when viewed in comparison with other three conventional techniques. The current study showed that the technique *TF-Test Modified* can be used comprehensively in qualitative diagnosis of intestinal protozoa and helminths of humans. The gain in diagnostic sensitivity afforded by this new technique should be estimable contribution to the individual diagnostic laboratory, population surveys and control of intestinal parasites, in order to reflect on social contribution.

Keywords: *TF-Test Modified*; Parasitology – Methods; Intestines – Parasites; Medical parasitology – Diagnosis; Laboratory diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Locais utilizados para coleta de amostras fecais.....	15
Figura 2:	Utensílios entregues aos voluntários para a realização de coleta de material fecal.....	16
Figura 3:	Instruções de coleta das amostras de fezes nos tubos do kit <i>TF-Test</i>	17
Figura 4:	Laboratório de Informática Visual (LIV) Biomédica.....	18
Figura 5:	Detalhamento de peças que compõem o <i>Kit TF-Test</i>	20
Figura 6:	Protocolo operacional da técnica de <i>TF-Test Convencional</i>	22
Figura 7:	Protocolo operacional da técnica de <i>TF-Test Modified</i> , na etapa flutuação-espontânea	24
Figura 8:	Protocolo operacional da técnica de <i>TF-Test Modified</i> , etapa de sedimentação-espontânea.....	26
Figura 9:	Fórmulas utilizadas para avaliação da performance diagnóstica das técnicas parasitológicas.....	30
Figura 10:	Estrutura vacuolar de <i>Blastocystis hominis</i>	44
Figura 11:	Cistos de <i>Giardia duodenalis</i> com aumento microscópico de 400 vezes.....	46
Figura 12:	Identificação de ovos férteis de <i>Ascaris lumbricoides</i> utilizando duas técnicas parasitológicas.....	48
Figura 13:	Ovos de ancilostomatídeos obtidos por duas técnicas parasitológicas.....	49
Figura 14:	Detecção de ovos de <i>Taenia</i> spp. pela técnica de <i>TF-Test Conventional</i>	51
Figura 15:	Detecção de ovos de <i>Taenia</i> spp. pela técnica de <i>TF-Test Modified</i>	52
Figura 16:	Larvas de <i>Strongyloides stercoralis</i> identificadas por diferentes técnicas.....	56
Figura 17:	Ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> obtidos pelo emprego de três técnicas parasitológicas.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Positividade e tipo de infecção apresentada no estudo de 457 indivíduos por quatro diferentes técnicas parasitológicas.....	32
Tabela 2:	Espécies parasitárias detectadas no estudo de 457 indivíduos por quatro técnicas parasitológicas.....	33
Tabela 3:	Performance diagnóstica de quatro técnicas parasitológicas no estudo de 457 indivíduos.....	34
Tabela 4:	Performance diagnóstica de três técnicas parasitológicas na pesquisa de <i>S. stercoralis</i> em um estudo com 457 indivíduos.....	34
Tabela 5:	Desempenho diagnóstico de três técnicas parasitológicas na pesquisa de <i>S. mansoni</i> em um estudo com 457 indivíduos.....	35
Tabela 6:	Análise dos valores preditivo positivo e negativo e resultados falso-positivo e falso-negativo das técnicas <i>TF-Test Modified</i> e <i>TF-Test Modified</i> no encontro de helmintos e protozoários intestinais.....	35
Tabela 7:	Análise de valores preditivos de resultados positivos e negativos e resultados falsos positivos e falsos negativos das técnicas de <i>TF-Test Modified</i> , <i>TF-Test Conventional</i> e Rugai, Mattos e Brisola, no diagnóstico específico de larvas de <i>S. stercoralis</i>	36
Tabela 8:	Análise dos valores preditivos de resultados positivos e negativos e resultados falsos positivos e falsos negativos das técnicas de <i>TF-Test Modified</i> , <i>TF-Test Conventional</i> e Kato-Katz/ <i>Helm-Test</i> , no diagnóstico qualitativo de ovos de <i>S. mansoni</i>	37
Tabela 9:	Eficiência diagnóstica de quatro técnicas parasitológicas, em termos de índice <i>Kappa</i> , índice de concordância (IC) com estimativa de 95% e valor DP, no estudo de 457 indivíduos.....	38
Tabela 10:	Eficiência diagnóstica de três técnicas parasitológicas no diagnóstico de <i>S. mansoni</i> , em termos de índice <i>Kappa</i> , índice de concordância a 95% e calculo Z no estudo de 457 voluntários.....	39
Tabela 11:	Eficiência diagnóstica de três técnicas parasitológicas no diagnóstico de <i>S. stercoralis</i> em termos de índice <i>Kappa</i> , índice de concordância a 95% e calculo Z no estudo de 457 voluntários.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EMEI:	Escola Municipal de Educação Infantil
EPF:	Exame Parasitológico de Fezes
FAPESP:	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
LIV:	Laboratório de Informática Visual
MSB:	Ministério da Saúde do Brasil
OMS:	Organização Mundial de Saúde
PCR:	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>TF-Test:</i>	<i>Three Fecal Test</i>
UBS:	Unidades Básicas de Saúde
UNICAMP:	Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Importância do Estudo.....	1
1.2 Parasitoses Intestinais e Problema de Saúde Pública.....	2
1.3 Parasitoses Intestinais e suas Causas.....	5
1.4 Evolução no Diagnóstico das Parasitoses Intestinais.....	10
2 OBJETIVO.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3 MATERIAS E MÉTODOS.....	15
3.1 Amostragem e Locais de Coleta.....	15
3.2 Coleta de Amostra	16
3.3 Laboratórios de escolha.....	18
3.4 Técnicas Parasitológicas.....	19
3.5 Técnica de <i>TF-Test Conventional</i> e <i>TF-Test Modified</i>	19
3.5.1 Apresentação do <i>Kit TF-Test</i>	19
3.5.2 Protocolo operacional da técnica <i>TF-Test Convencional</i>	20
3.5.3 Protocolo operacional da técnica <i>TF-Test Modified</i>	23
3.5.3.1 Flutuação-espontânea para a detecção de cistos e protozoários e ovos leves de helmintos.....	23
3.5.3.2 Sedimentação-espontânea para detecção de ovos pesados e larvas de helmintos.....	25
3.6 Técnica de Rugai, Mattos e Brisola.....	27
3.7 Método de Kato, modificado por Katz e cols. / <i>Helm-Test</i>	27
3.7.1 Técnica <i>Helm-Test</i>	27
3.8 Critério de Escolha de Solução Corante.....	28
3.9 Controle de Qualidade e Biossegurança.....	29
3.10 Análises de Resultados.....	29
4 RESULTADOS	31

5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO	62
7 ANEXO	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância do Estudo

As parasitoses intestinais são altamente prevalentes no mundo, estando atualmente entre as maiores causadoras de doenças e óbitos em seres humanos, principalmente por sua ampla distribuição geográfica e possíveis consequências danosas (MORRONE *et al.* 2004; PEZZANI *et al.*, 2009; YAMADA *et al.*, 2010; YODER *et al.*, 2010). O Brasil, especialmente por ser um país em desenvolvimento e estar localizado em uma região do planeta que apresenta clima tropical, subtropical e equatorial, exibe condições amplamente favoráveis para o estabelecimento destas enfermidades parasitárias (BARRETO *et al.*, 2010).

Segundo relatório da Organização Pan Americana de Saúde (em inglês, PAHO) e da Organização Mundial de Saúde (em inglês WHO), no ano de 2007, em todo o mundo, mais de 3,5 bilhões de pessoas encontravam-se infectadas por enteroparasitos, apresentando como resultado cerca de 450 milhões de doentes, resultando em um grave problema de Saúde Pública. De acordo ainda com o mesmo relatório, as doenças infecciosas e parasitárias foram consideradas como estando entre as principais causas de mortes, sendo responsáveis por 2 a 3 milhões de mortes por ano em todo o mundo. Outrossim, este mesmo documento indicou que uma de cada dez pessoas do planeta sofria de infecção por uma ou mais das dez principais parasitoses humanas, que incluíam: ascaríase, esquistossomíases, ancilostomíases, malária, tricuriase, amebíase, filariase, giardíase, tripanossomíases e leishmaníases.

No Brasil, em 2002, o Sistema Único de Saúde (SUS) e o Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE) estimaram existir mais de 88 milhões de pessoas infectadas por parasitoses da luz intestinal, refletindo em mais de 51% da população, que se encontrava contagiada por pelo menos uma espécie parasitária. Dentre esta parcela de infectados os mais atingidos eram crianças, sobretudo por possuírem hábitos de higiene inadequados e, em muitos casos, desnutrição e sistema imunológico imaturo. Convém mencionar que, notavelmente em indivíduos adultos, a debilidade do organismo parasitado pode levar a diminuição ou perda da capacidade de trabalho, que já se apresenta como baixa em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, podendo ainda ocasionar um grande número de enfermos que possibilitam comprometer os orçamentos familiares e do Estado (AHMED *et al.*, 2011; FATHY, 2011).

As enteroparasitoses são capazes de acarretar imensos prejuízos à saúde de um indivíduo infectado, como exemplo, agravamento do estado nutricional, ocasionado em grande parte por lesões na mucosa intestinal, que impedem ou reduzem a absorção de nutrientes, podendo suceder diversas consequências, tais como: anemia, diarreia e diminuição do desenvolvimento orgânico, como físico e mental (YAMADA *et al.*, 2010; AJJAMPUR, *et al.*, 2011). Como forma de propagação, parasitos liberam formas de resistências juntamente com o bolo fecal, sendo, por vezes, estas estruturas detectadas de forma direta, mediante o emprego do Exame Parasitológico das Fezes, denominado por alguns autores de EPF (GARCIA, 2009). Atualmente há diferentes metodologias para o emprego do exame de fezes, como métodos diretos ou técnicas de concentração, que podem apresentar sensibilidades diagnósticas variadas (MENDES *et al.*, 2005; BRANDELLI *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2012). O desenvolvimento e análise do potencial diagnóstico de técnicas coproparasitológicas permite investigar a confiabilidades das técnicas, visando obter resultados eficientes em rotinas laboratoriais e em programas de controle das parasitoses intestinais em Saúde Pública.

1.2 Parasitoses Intestinais e Problema de Saúde Pública

A qualidade em saúde, sua prevenção e manutenção são frequentes problemas enfrentados nos países em desenvolvimento (FUNASA, 2004). Está bem estabelecido que a ausência ou insuficientes condições de saneamento básico e inadequadas práticas de higiene são os principais mecanismos que favorecem a transmissão dos parasitos intestinais (KORKES *et al.*, 2009; IBGE, 2009). Alguns programas governamentais tem sido implementado para o controle das enteroparasitoses (BRASIL, 2005). No entanto, nos países subdesenvolvidos a ineficiência dessas iniciativas esta relacionado com o baixo suporte para a adoção de medidas de saneamento básico (BARRETO *et al.*, 2010; MINAMOTO *et al.*, 2012) e da existência de populações que mostram: a) baixo poder econômico; b) alimentação insuficiente; c) subempregos; d) falta de higiene; e e) condições sanitárias e de habitações inadequadas (KORKES *et al.*, 2009; DAMEN *et al.*, 2011). No mundo, ao longo da história, as infecções ocasionadas por parasitoses intestinais em humanos têm sido consideradas como um dos mais sérios problemas de Saúde Pública. No passado, segundo relatos de Pessoa, entre os anos de 1949 e 1963, nas regiões dos trópicos de Câncer e Capricórnio existiam mais populações helmínticas que humanos, devido ao fato de na

época grande parte da população humana estar concentrada na zona rural, que apresentava alta prevalência para helmintíases e com altas intensidades de infecções parasitárias por indivíduo. Analisando diversos estudos epidemiológicos sobre helmintíases, a depender da região do planeta, verifica-se que esta situação ainda prevalece (AHMED *et al.*, 2011; CISSÉ *et al.*, 2011).

Levantamentos epidemiológicos têm sido utilizados globalmente como importantes instrumentos para monitorar o progresso na promoção da saúde (AHMED *et al.*, 2011; GUIDETTI *et al.*, 2010). Pesquisas realizadas em alguns países da África mostraram resultados alarmantes, em Camarões um estudo realizado em escolas de duas aldeias, detectou que 50% das crianças e adolescentes entre 5 a 15 anos estavam parasitados (FOUAMNO-KAMGA *et al.*, 2011). Em Moçambique a positividade foi de 60% entre estudantes, havendo maior prevalência dos helmintos: *S. stercoralis* e ancilostomídeos e dos protozoários: *Dientamoeba fragilis* e *G. duodenalis* (GUIDETTI *et al.*, 2011). Em escolas rurais da Nigéria encontrou-se parasitismo intestinal em 80% dos alunos, muito deles com alto risco de obstrução intestinal (DAMEN *et al.*, 2011).

Algumas nações asiáticas possuem elevadas cargas parasitárias de helmintos, na região sul da Índia, o número de casos positivos para helmintos foi de 34% nas crianças em idade escolar, sendo *A. lumbricoides* responsável por 43% das infecções (RAGUNATHAN *et al.*, 2010). Na região sul de Laos, país localizado entre a Tailândia e Vietnã, 86% dos indivíduos abrigam de duas até sete espécies de helmintos simultaneamente (SAYASONE *et al.*, 2011). Uma revisão da epidemiologia de helmintos transmitidos por solo de 1970 a 2009 feita em povos indígenas, funcionários públicos e favelas urbanas da Malásia, constatou que *Trichuris trichiura* é o helminto mais prevalente, seguido de *A. lumbricoides* podendo atingir respectivamente até 98%, 86% dos indivíduos, dependendo da região estudada (AHMED *et al.*, 2011).

Na Europa, pesquisas recentes demonstram que 7,4% dos italianos encontram-se parasitados (GUIDETTI *et al.*, 2010), sendo superados pela Espanha com 13,7%, em ambos os países a espécie parasitária *B. hominis* é a mais prevalente (GUIDETTI *et al.*, 2010; GONZÁLEZ-MORENO *et al.*, 2010). Na Albânia, as parasitoses intestinais predominam em cerca de 19% das crianças, com maior incidência de *G. duodenalis* (SEJDINI *et al.*, 2011). Diversos países das Américas como Haiti, Cuba, Argentina, Bolívia, México e Canadá tem relatado por meios de inquéritos epidemiológicos suas preocupações e dificuldades no controle e combate das parasitoses intestinais na saúde pública (ESCOBEDO *et al.*, 2008; TANNER *et al.*,

2009; UHLMANN *et al.*, 2009; NISKA & SLOAND, 2010; MOLINA *et al.*, 2011; JIMENEZ-GONZALES *et al.*, 2012). Nem mesmo a maior economia do planeta mostrou-se livre das infecções parasitárias, os Estados Unidos tem divulgado frequentes surtos de veiculação hídrica causados por protozoários, provocando quadros de diarreia e desidratação (CRAUN *et al.*, 2010; HLAVSA *et al.*, 2011).

No Brasil, há quase um século, as parasitoses do trato intestinal humano, constitui grande problema na saúde pública (FUNDAÇÃO ROCKFELLER, 1992; GONÇALVES *et al.*, 2011). Segundo achados da literatura, os primeiros levantamentos epidemiológicos realizados no país ocorreram entre os anos de 1.916 e 1.921 apresentando positividade diagnóstica que variaram de 78% a 99%, destacando as helmintíases intestinais, sobretudo pelo fato de na época predominar as endemias rurais (FUNDAÇÃO ROCKFELLER, 1992).

Inquéritos epidemiológicos realizados na cidade de São Paulo, SP, nas décadas de 30, 40 e 50, evidenciaram positividade diagnóstica média de 55% para ascaridíase e 53% para ancilostomíase, chegando a atingir até 100% de casos positivos em regiões litorâneas do Estado de São Paulo (PÊSSOA, 1963). Por volta do ano de 1.960, pesquisas realizadas no país apresentaram prevalência média de 63% para ascaridíase na população (VINHA, 1969). Segundo Campos & Briques (1988), no final da década de 80, ao menos 60% da população brasileira apresentavam infecções parasitárias. No entanto, após a década de 80, especialmente com a migração da população rural para os centros urbanos em busca de trabalho, associados com a dificuldade do poder público em criar políticas habitacionais adequadas, proporcionou a concentração da população de forma desorganizada com precárias condições sanitárias e moradias inadequadas, estimulando os grandes bolsões de pobreza e a crescimento de domicílios em favelas (RIBEIRO, 1995),

Como medida de controle das parasitoses o Ministério da Saúde lançou o Plano Nacional de Vigilância e Controle das Enteroparasitoses com o objetivo de reduzir a prevalência, morbidade e mortalidade das parasitoses intestinais no Brasil (BRASIL, 2005). Contudo, o acentuado êxodo rural, a expansão de favelas e o saneamento básico inadequado proporcionam um ambiente favorável para o estabelecimento e exposição das doenças parasitárias nos centros urbanos (KORKES *et al.*, 2009). Isso reflete atualmente em 11 milhões de brasileiros vivendo em favelas em todo o país (IBGE, 2010) e diversos levantamentos epidemiológicos que relatam as infecções parasitárias do trato intestinal continuam a prevalecer em todas as regiões do país.

Em Uruguaiana, estado do Rio Grande do Sul, um estudo detectou positividade de 38,4% de crianças de creches municipais (CHAVES *et al.*, 2006). Em Manaus/AM, enteroparasitoses estavam presentes em 58,9% das crianças de até dez anos que frequentavam o ambulatório médico da capital do estado do Amazonas (MAIA *et al.*, 2009). Estudos realizados em favelas de diversas regiões do Estado de São Paulo demonstrou média de 30% de parasitoses em crianças e adolescentes de dois a quatorze anos (KORKES *et al.*, 2009). Em Goiás 36,2% dos pacientes atendidos pelo serviço público de saúde do hospital municipal de Cumari/GO encontravam-se parasitados (BORGES *et al.*, 2011).

É fato que quase 100 anos se passaram desde os primeiros inquéritos parasitológicos realizados no Brasil (FUNDAÇÃO ROCKFELLER, 1992) e apesar dos esforços no combate as parasitoses, as infecções intestinais ainda são comuns (FUNASA, 2004; BRASIL, 2005), todavia, as infecções ocasionadas por enteroparasitoses têm sido amplamente negligenciadas, apesar de ocuparem lugar de destaque entre as endemias nacionais e internacionais (HOLVECH *et al.*, 2007).

1.3 Parasitoses Intestinais e suas Causas

As parasitoses intestinais podem causar muitos danos a seus portadores, sobremaneira ao acometer animais vertebrados, como exemplo, humanos. Entre outros agravos, as infecções ocasionadas por estas parasitoses podem originar obstrução intestinal, desnutrição, anemia por deficiência de ferro, quadros de diarreia, má absorção intestinal, etc., sendo as suas manifestações clínicas usualmente proporcionais à intensidade de infecção e o grau de imunidade de um indivíduo parasitado (YAMADA *et al.*, 2010; AJJAMPUR, *et al.*, 2011; DAMEN *et al.*, 2011).

Dentre os agrupamentos existentes entre protozoários e helmintos do trato digestório, os protozoários de humanos são encontrados em elevadas prevalências em quase todas as regiões do planeta (BALDURSSON & KARANIS, 2011). Dentre as protozooses intestinais responsáveis por desencadear diversos surtos em todo o mundo, destacam-se: a amebíase, a giardíase, a blastocistíase e as coccidioses (BALDURSSON & KARANIS, 2011). A amebíase é uma doença cosmopolita, causada pela infecção por *Entamoeba histolytica*, constitui a segunda maior causa de mortalidade entre as protozooses de humanos, sendo superada apenas pela malária (RALSTON & PEDRI, 2011). Estima-se que 10% da população mundial esteja infectada por

E. histolytica e que 50 milhões de pessoas possuam a forma invasiva da doença, resultando em aproximadamente 100 mil mortes por ano (TENGGU & NORHAYATI, 2011). A doença é capaz de proporcionar inúmeros prejuízos à saúde humana, tais como: úlceras intestinais, perfuração do intestino, peritonite, apendicite, abscesso de fígado, lesões cutâneas e genitais, etc. (SARDA *et al.*, 2011; TENGGU & NORHAYATI, 2011). Outros amebídeos que podem parasitar o intestino humano sem causar doença são: *Endolimax nana*, *Iodamoeba butschlii*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba polecki* (eventualmente presente em humanos), *Entamoeba hartmanni* e *Entamoeba dispar*, sendo esta última morfologicamente semelhante às estruturas de *E. histolytica* (GARCIA, 2009; BRASIL, 2010). Este o motivo de a OMS recomendar a liberação de resultados diagnósticos da forma *E. histolytica* / *E. dispar*, sobretudo quando realizado por meio do exame parasitológico das fezes (WHO, 2004). Haja vista que, somente o estudo de caracterização molecular será capaz de diferenciar estas duas espécies (ELBAKRI *et al.*, 2013).

A Organização Mundial de Saúde (2009) estima que aproximadamente 400 milhões de pessoas possuam giardíase em todo o mundo. O agente etiológico da giardíase, *G. duodenalis* (sinonímia: *G. intestinalis*, *G. lamblia*) trata-se de um parasito frequentemente diagnosticado em exames coproparasitológicos, acometendo na maioria das vezes crianças, que podem apresentar quadros de diarreia e má absorção intestinal (SANTOS & MERLINI, 2010).

Apesar de controverso e pouco identificado em exames parasitológicos das fezes, talvez, pelo pequeno conhecimento dos profissionais de microscopia, o parasito *B. hominis* atualmente é considerado como protozoário e conforme relato da literatura, pode ser o causador de uma severa infecção intestinal denominada de blastocistíase, apresentando sintomas não específicos, os quais podem ocasionar vários quadros de enfermidades, como exemplo: diarreia, dor abdominal, cólica, náusea, febre, vômito e flatulência (TAN *et al.*, 2002; USTÜN & TURGAY, 2006; GARCIA, 2009; SHAH *et al.*, 2012; REBOLLA, 2012). Este parasito é polimórfico e pode apresentar diversas formas, como: vacuolar, granular, multivacuolar, amebóide, avacuolar e cística, as quais podem variar os tamanhos de 6 µm a 60 µm (GARCIA, 2009; REBOLLA, 2012). Como em outras espécies parasitárias intestinais, a transmissão deste parasito parece ocorrer por via fecal-oral, embora isto não tenha sido confirmado experimentalmente, e é muito provável que a forma cística seja responsável pela transmissão seguida de infecção (TAN *et al.*, 2002; SURESH & SMITH, 2004; GARCIA, 2009; POIRIER *et al.*, 2012). Os achados de diversos estudos têm sugerido que *B. hominis* apresenta distribuição

cosmopolita, sendo efetivamente o protozoário do trato intestinal mais prevalente em humanos (GARCIA, 2007; SHAH *et al.*, 2012; REBOLLA, 2012; POIRIER *et al.*, 2012), infectando indivíduos em países desenvolvidos, em desenvolvimento e subdesenvolvidos, preferencialmente localizados nas zonas tropicais do planeta. As positivities diagnósticas deste parasito têm se mostrado superiores em cerca de 30% a 50% em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento do que as observadas em países desenvolvidos (AL & HÖKELEK, 2007; POIRIER *et al.*, 2012).

Por sua vez, os coccídios intestinais, considerados pela literatura como protozoários emergentes e oportunistas, foram reconhecidos como patógenos de humanos em anos não muito remotos, mais precisamente após a década de 80 e em sucessão ao surgimento da pandemia da AIDS (em inglês, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*), notavelmente por causarem infecções graves em indivíduos imunocomprometidos (ARORA & ARORA, 2009). Entretanto, em portadores imunocompetentes, por vezes, esta infecção se apresenta como benigna e autolimitada (BAIOMY *et al.*, 2010; NEIRA *et al.*, 2010). Vale ressaltar que, entre as coccidíases humanas, encontram-se em destaque: *Isospora belli*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis* e *Sarcocystis hominis* (WHO, 2004).

Dentre os helmintos, os geohelmintos *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* são os de maior prevalência, com estimativas de infecção em quase um sexto da população mundial (HARHAY, *et al.*, 2010). Ascaridíases está presente em aproximadamente 1,2 milhões de indivíduos no mundo (WHO, 2009). Os vermes adultos de *A. lumbricoides* podem causar ação espoliadora, tóxica ou mecânica, em infecções de carga parasitaria moderada. Nas infestações maciças há grande consumo de proteínas, vitaminas, lipídios e carboidratos, resultando em desnutrição, principalmente em crianças (DOLD & HOLLAND, 2011). Lesões pulmonares são resultantes da passagem da forma larvar nos alvéolos, formando pontos hemorrágicos com um quadro de broncoespasmo, hemoptise e pneumonite, caracterizando a síndrome de Löeffler (BRASIL, 2010). No intestino, os vermes adultos podem enovelar e causar obstrução intestinal, levando o hospedeiro a óbito (DOLD & HOLLAND, 2011).

Tricuríase, uma doença cosmopolita, com prevalência estimada em 795 milhões de pessoas (WHO, 2009), frequentemente esta associadas com a ascaridíases, devido ao semelhante modo de transmissão e grande potencial de fertilidade das fêmeas (VAVRICKA, *et al.*, 2009). Em baixas cargas parasitárias de *T. trichiura* a doença é assintomática. Nos casos sintomáticos

mais graves levam a à extensa necrose da mucosa intestinal, diarreia sanguinolenta e prolapso retal, no entanto, em baixa carga parasitária pode ser assintomático (VAVRICKA, *et al.*, 2009).

Enterobius vermicularis, conhecido popularmente como oxiúro, é considerado um helminto cosmopolita, diferentemente de muitas parasitoses é comum em países desenvolvidos, apresenta uma biologia peculiar de outras parasitoses intestinais (PEZZANI *et al.*, 2004). A transmissão da enterobíase ocorre com maior frequência em instituições comunitárias, como, creches, orfanatos e asilos (CRAGGS *et al.*, 2009). A alteração mais intensa e característica é o prurido anal, principalmente à noite (BRASIL, 2010).

Outros helmintos intestinais, como por exemplo, Ancilostomídeos e *S. stercoralis*, habitualmente infectam o homem por penetração subcutânea e podem ocasionar dermatite cutânea, hemorragia e anemia (DIEMERT *et al.*, 2008; BRASIL, 2010). A ancilostomíase, doença atribuída aos Ancilostomídeos, atinge mundialmente cerca de 700 milhões de indivíduos (WHO, 2009), é conhecida comumente em algumas regiões do nosso país como doença do amarelão, devido, quase que continuamente, à presença de acentuada anemia no hospedeiro que apresenta alta carga parasitária. Trata-se de um dos principais sintomas desta doença, resultante do intenso hematofagismo de duas espécies mais prevalentes deste nematódeo em humanos, tais como: *A. duodenale* e *N. americanus* (BRASIL, 2010). As larvas dos ancilostomídeos podem provocar, no local de penetração, lesões traumáticas, seguidas por fenômenos vasculares, que irão originar a dermatite urticariforme. Alterações pulmonares, ocasionados pela passagem das larvas nos pulmões e árvore brônquica são pouco usuais, embora possam ocorrer manifestações semelhantes à ascaridíase, incluindo a síndrome de *Löffler* (DIEMERT *et al.*, 2008).

Já a estrogiloidíase, doença devido a *S. stercoralis*, possui prevalência estimada entre 50 a 100 milhões de indivíduos em todo o mundo. Trata-se de uma doença endêmica em regiões tropicais úmidas, podendo persistir durante anos por consequência da autoinfecção no hospedeiro (MONTES *et al.*, 2010). A infecção crônica ocasionada por *S. stercoralis* pode ser assintomática ou provocar sintomas gastrintestinais e pulmonares (MIRDHA *et al.*, 2009). Pacientes imunocompetentes podem desenvolver uma infecção assintomática crônica com sintomas leves, no entanto, em imunodeprimidos esta doença pode apresentar quadros graves e com alta mortalidade (MONTES *et al.*, 2009).

A esquistossomíase mansônica, conhecida popularmente em diferentes regiões do Brasil por xistossomose, xistosa, doença do caramujo e barriga d'água, é considerada como uma das principais doenças parasitárias do planeta. Atualmente, as esquistossomíases proporcionam um quadro de mais de 200 milhões de infectados no mundo, e acometem óbitos em mais de 500 mil portadores/ano (ANDRADE, 2009; KAPPAGODA *et al.*, 2011). Estas doenças ocorrem em 54 países, destacando-se os da África, leste do Mediterrâneo, América do Sul e Caribe. No Brasil, a esquistossomíase mansônica é considerada como uma doença endêmica e persistente e atinge aproximadamente 19 Unidades Federativas (BRASIL, 2010). A maioria dos sintomas desta doença é devida à liberação pela fêmea do verme adulto de grande quantidade de ovos imunogênicos na corrente sanguínea, que provocam reações inflamatórias locais, substituindo o tecido inflamado por tecido fibroso. Em quadros crônicos, pode conduzir o hospedeiro a quadros de hepatopatia e enteropatia com hepatomegalia, ascite, diarreia, etc. Convém mencionar que as formas mais graves desta doença, como exemplo, hepatomegalia e hipertensão portal, estão relacionadas como entre as principais causas de morte por esquistossomíase no Brasil (ANDRADE, 2009; BRASIL, 2010; DOMINGUES *et al.*, 2011).

Pouco se sabe sobre a epidemiologia global das doenças ocasionadas por cestóides do trato digestório de humanos. Entretanto, tem sido sugerido que a infecção ocasionada por *Taenia* spp. não seja tão frequente em crianças e adolescentes que vivem em regiões de pobreza tropical, já que possuem acesso limitado às carnes que servem como fontes de infecção (HARHAY, *et al.*, 2010). A teníase é caracterizada pela presença do verme adulto ao longo do intestino delgado, adquire-se após a ingestão de carne bovina e suína mal cozida contendo a forma larval de *Taenia saginata* e *Taenia solium*, respectivamente (KAPPAGODA *et al.*, 2011). Outra infecção pode ser ocasionada em humanos, porém, pela ingestão acidental de ovos de *T. solium* denominada cisticercose. Alguns autores sugerem que pelo menos mais cinco espécies podem estar relacionadas a esta infecção, tais como: *T. saginata*, *T. multiceps*, *T. hydatigena*, *T. ovis* e *T. taeniformis* (HARHAY, *et al.*, 2010; KAPPAGODA *et al.*, 2011). Uma vez implantado no hospedeiro, os cisticercos dão preferência em migrar em maior quantidade para o sistema nervoso central, causando a neurocisticercose, e, em menor quantidade para o globo ocular e tecido muscular (DEL BRUTTO, 2012). A evolução destes quadros podem ser assintomáticos ou apresentar sintomas inespecíficos. A neurocisticercose é a forma mais grave da doença e pode apresentar quadros de convulsões, hidrocefalia, hipertensão intracraniana, cefaleia, meningite

crônica e distúrbios psíquicos, sendo considerada por alguns autores como a principal causa de epilepsia em países em desenvolvimento (KAPPAGODA *et al.*, 2011; DEL BRUTTO, 2012).

Por fim, o parasitismo por *Hymenolepis nana* é cosmopolita, sendo mais frequente nas regiões de clima temperado e subtropical, tais como: sul da Europa; América Latina; norte da África; e Oriente Médio (KAPPAGODA *et al.*, 2011). Apesar de as infecções se mostrarem geralmente assintomáticas, em alguns estudos foi possível confirmar indivíduos apresentando desconforto abdominal e diarreia (CHERO *et al.*, 2007).

1.4 Evolução no Diagnóstico das Parasitoses Intestinais

As formas de eliminação de parasitos presentes no intestino do homem podem ser diagnosticadas nas fezes pelo encontro de cistos, oocistos, esporos e trofozoítos de protozoários, e ovos e larvas de helmintos. Apesar de ser muito usual em Saúde Pública, o diagnóstico destas parasitoses baseado somente no emprego de sintomas clínicos é impreciso, pois, é capaz de informar unicamente indícios semelhantes a várias outras infecções, como exemplo, os ocasionados por vírus e bactérias, tornando este tipo de diagnose apenas sugestivo (GOMES *et al.*, 2008; GARCIA, 2009). Sendo assim, para fazer conhecimento do diagnóstico conclusivo de enteroparasitoses, o exame parasitológico das fezes, por sua simplicidade e pelo fato de demonstrar boa sensibilidade e permitir identificar o agente causador da doença, deve ser recomendado e analisado em conjunto com as informações clínicas médicas (OZYURT *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2004; GARCIA, 2009; GOMES *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012).

Para a realização do EPF, há diferentes técnicas convencionais e *kits* empregados na rotina diagnóstica destes laboratórios (HOSHINO-SHIMIZU *et al.*, 2001; MENDES *et al.*, 2005; CARVALHO, *et al.*, 2012). Em grande parte, estas técnicas são processadas de forma mecânica, por meio de procedimentos diretos ou de concentração parasitária, como exemplo: sedimentação-espontânea, centrífugo-sedimentação, flutuação-espontânea, centrífugo-flutuação (GARCIA, 2009).

Os exames realizados de forma direta, a fresco, utiliza amostra de fezes recentemente emitida, quando se espera encontrar formas trofozoíticas que se evidenciem por sua motilidade

peculiar, ocorre geralmente em fezes líquidas espontâneas ou provocadas por medicação (TRABELSI *et al.*, 2012).

A técnica de Lutz (1919) ou Hoffman, Pons & Janer (1934), baseia-se no procedimento técnico de sedimentação-espontânea por ação da gravidade, é utilizado para pesquisa de ovos e larvas de helmintos nas fezes. O método de centrífugo-sedimentação descrito de Ritchie (1948) fundamenta-se na sedimentação pela centrifugação e lavagem do material com formol-éter, foi desenvolvido para o diagnóstico de ovos e larvas de helmintos, cistos e alguns oocistos de protozoários. O método apresentado por Faust e colaboradores (1939), tem como princípio a centrífugo-flutuação no sulfato de zinco permitindo a flutuação de estruturas leves, é usado para a pesquisa de cistos de protozoários e ovos leves de helmintos intestinais. A técnica proposta por Willis (1921) baseia-se na flutuação-espontânea, utilizando NaCl de densidade de 1,20g/mL, com isso, as estruturas parasitárias de densidade menor que a solução, tendem a flutuar, é indicado para a pesquisa de cistos de protozoários e ovos leves, principalmente de ancilostomídeos.

Por sua vez, a técnica de Kato-Katz (KATO & MIURA, 1954; KATZ *et al.*, 1970) comercializada atualmente por *Helm-Test*[®] (FIOCRUZ, 2008), que se mostra como quantitativa, presta-se para a identificação de ovos de algumas espécies de helmintos nas fezes, principalmente *S. mansoni*. Esta técnica baseia-se no princípio de clarificação das estruturas parasitárias (ovos) pela aplicação de material fecal em soluções de verde de malaquita e glicerina. Apesar de ser recomendada pelo Ministério da Saúde do Brasil (MSB) aos programas governamentais para controle da esquistossomíase mansônica, esta técnica não é indicada pela literatura para a detecção de outros ovos e larvas de helmintos, além de estruturas de protozoários intestinais (GOMES *et al.*, 2008; CARVALHO *et al.*, 2012). O diagnóstico de larvas de nematóides, que é frequentemente realizado pelas técnicas parasitológicas convencionais de Rugai, Mattos e Brisola (1954) e Baermann-Moraes (1917), fundamenta-se no princípio de termohidrotropismo positivo das larvas, que tendem a migrar para o fundo do cálice quando entram em contato com água a 45°C, esta técnica apresenta boa sensibilidade, todavia, é específico somente para a detecção de larvas de helmintos intestinais (CARVALHO *et al.*, 2012).

Métodos imunológicos diretos e indiretos tem sido empregados para detectar antígenos, anticorpos e imunocomplexos relacionados com a existência da infecção e imunidade adquirida, e podem ser aplicados no diagnóstico diferencial entre doenças com quadro clínicos semelhantes e inquéritos epidemiológicos de massa (MARVA & GROSSMAN, 2010). A sorologia permite

muitas vezes determinar a fase clínica da parasitose em função da classe de imunoglobulinas (IgM e IgG) que se encontram alteradas em cada fase da infecção (MARTÍN-RABADÁN *et al.*, 2010). No entanto, devem ser devidamente interpretados, pois, podem ocorrer falsos resultados decorrentes da variação antigênica do patógeno, reações cruzadas, resposta exacerbada do hospedeiro ou ausência de resposta imunológica do hospedeiro contra epítomos dos parasitos (MARTÍN-RABADÁN *et al.*, 2010; MARVA & GROSSMAN, 2010).

Técnicas moleculares possuem excelentes sensibilidades. O PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e seus derivados, é utilizado em casos específicos, como por exemplo, na diferenciação de espécies morfológicamente semelhante e/ou em pesquisas científicas. Seus usos são limitados em rotina laboratorial principalmente por seu alto custo, tornando sua utilização como diagnóstico em casos excepcionais de diagnóstico das enteroparasitose (MURPHY *et al.*, 2011; ELBAKRI *et al.*, 2013).

Kits comerciais e técnicas convencionais podem ser específicos para determinados grupos de parasitos e utilizam uma única amostra de fezes por processamento. Dependendo do estágio parasitário e da biologia do parasito pode ocorrer oscilações diárias na eliminação de ovos e larvas de helmintos e cistos e oocistos de protozoários, associados ao grau de parasitismo de intensidade moderada a baixa, resulta em diminuição de sensibilidade diagnóstica (HOSHINO-SHIMIZU *et al.*, 2001). Desta maneira, alguns autores passaram a sugerir a coleta de três amostras de fezes em dias alternados e a utilização de três técnicas parasitológicas em rotina laboratorial na tentativa de suprir as reduções de sensibilidade das técnicas convencionais e/ou *kits* comerciais (GARCIA, 2007; GARCIA, 2009). Entretanto, esta prática torna a rotina laboratorial complexa de maneira a inviabilizar o uso deste procedimento técnico em laboratórios de análises clínicas, sobremaneira nos públicos do país, que dependem de repasses financeiros do Sistema Único de Saúde - SUS (GOMES *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2008).

Em vista do exposto, novas técnicas parasitológicas e *kits* comerciais foram desenvolvidos na tentativa de tornar eficaz e prático o diagnóstico das enteroparasitoses (GOMES *et al.*, 2008). Na última década, por meio das fases de viabilização, desenvolvimento e validação de um projeto de inovação científica e tecnológica, que recebeu os apoios irrestritos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), uma técnica parasitológica (*TF-Test - Three Fecal Test*) foi validada e implantada em rotinas de laboratórios de análises clínicas do país. Ao longo dos últimos anos,

esta nova técnica vem se destacando no diagnóstico destas parasitoses, especialmente por coletar separadamente três amostras fecais em dias alternados, processá-las de uma só vez com procedimento laboratorial de concentração parasitária por centrífugo-sedimentação (HOSHINO-SHIMIZU, *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2004; GOMES, 2008; GOMES *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012; REBOLLA, 2012).

Em diferentes estudos, a técnica parasitológica de *TF-Test*, neste estudo denominado de *TF-Test Conventional* foi avaliada comparativamente com a técnica de flutuação-centrifugada com o uso de solução saturada de sulfato de zinco, Faust e colaboradores (1939), mais especificamente por Hoshino-Shimizu e colaboradores (2003), Gomes e colaboradores (2004), Lumina e colaboradores (2005) e Coelho e colaboradores (2012), demonstrando superioridade diagnóstica para a detecção de cistos de protozoários e larvas/ovos de helmintos. Em análogo, as técnicas de *TF-Test Conventional* e sedimentação espontânea, ou Lutz (1919) / Hoffman, Pons & Janer (1934), foram avaliadas comparativamente por Hoshino-Shimizu e colaboradores (2003), Gomes e colaboradores (2004) e Carvalho e colaboradores (2012), com os resultados demonstrando superioridade diagnóstica à técnica de *TF-Test Conventional*. Em continuidade ao desenvolvimento científico e tecnológico da técnica parasitológica de *TF-Test Conventional*, uma equipe de pesquisadores viabilizou em laboratório a técnica de *TF-Test Modified* (FALCÃO *et al.*, 2010), a qual avaliamos neste estudo.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar e validar a técnica parasitológica *TF-Test Modified*, em relação as técnicas *TF-Test Conventional*, Rugai, Mattos e Brisola e Kato-Katz/*Helm-Test* no diagnóstico de parasitos intestinais.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a confiabilidade geral da técnica *TF-Test Modified*, especialmente de forma estatística, em termos de parâmetros diagnósticos de sensibilidade, especificidade e eficiência diagnóstica;
- Fornecer subsídios para introdução de melhorias para técnica *TF-Test Modified*;
- Transmitir informações sobre educação sanitária a todos os voluntários e familiares envolvidos na pesquisa.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem e Locais de Coleta de Amostra Fecal

Para a realização do estudo, um total de 457 amostras de fezes foi obtido de voluntários, sendo 185 oriundas de crianças de 9 meses a 7 anos de idade, matriculadas em duas Escolas Municipais de Educação Infantil (EMEI), localizadas na região Sudoeste do Município de Campinas, SP. Outras 272 amostras foram provenientes de indivíduos de 4 a 72 anos, considerados como usuários de Unidades Básicas de Saúde (UBS) da rede pública municipal, localizadas nas regiões Sul e Sudeste de Campinas, SP. O critério adotado para a escolha dos locais de coleta foi amparado em instituições localizadas em regiões periféricas e com moradias inadequadas, que mostraram parciais condições sanitárias (figura 1).

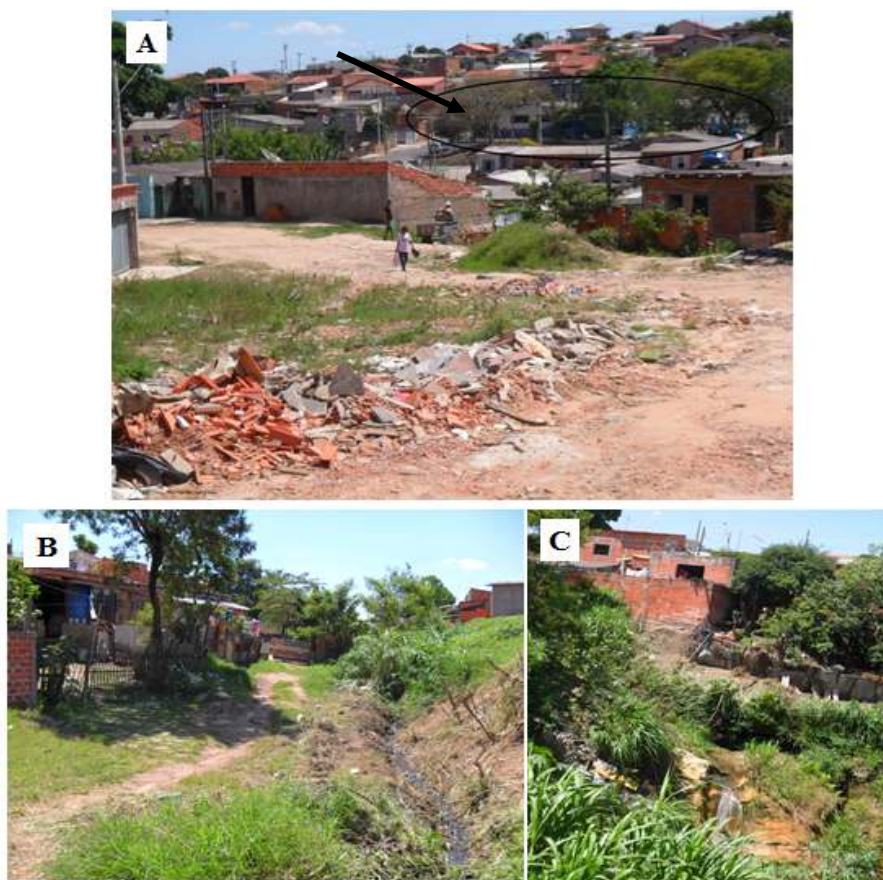


Figura 1: Imagens exemplificando locais utilizados para coleta de amostras fecais. (A), Creche localizada no bairro Jardim Liliza, Campinas, SP (conforme seta); (B) e (C) residências sem redes de água de consumo e esgoto, estando situadas a cerca de 50 metros da mesma creche.

Nas instituições anteriormente mencionadas (EMEI e UBS), todos os voluntários receberam orientações preventivas sobre higiene, medidas de educação sanitária. Convém ressaltar que, para a realização do efetivo projeto, recebemos a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, com o número de protocolo 570/2011 (anexo A).

3.2 Coleta de Amostra Fecal

Nas palestras acima citadas, à orientação de coleta de amostras fecais, de acordo com figura 2, cada voluntário recebeu vários utensílios, a saber: frasco coletor universal de boca larga etiquetado e numerado; espátula de madeira para auxílio na coleta de material fecal; três tubos coletores usuário *TF-Test*, com a identificação do número de cada voluntário; e um manual de instruções para coleta (anexo B).

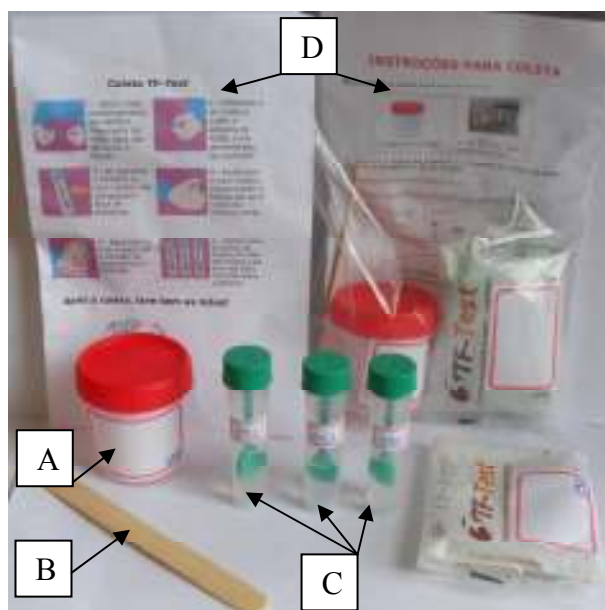


Figura 2: Imagem mostrando utensílios entregues aos voluntários para a realização de coleta de material fecal: A, Frasco coletor universal; B, espátula de madeira; C, tubos coletores *TF-Test*; e D, manuais de instruções para coleta.

Em uma primeira etapa, os voluntários foram orientados a coletar três amostras de fezes em dias alternados (dia sim, dia não), e em um período de tempo que não ultrapassou a 10 dias. As coletas em dias alternadas foram realizadas nos tubos coletores *TF-Test*, mais precisamente para processamento laboratorial das técnicas de *TF-Test Conventional* e *TF-Test Modified*, tendo como parâmetro os manuais de instruções apresentados nas embalagens dessas técnicas parasitológicas (figuras 2 e 3).

Em uma segunda etapa de coleta, amostras fecais foram adquiridas para as demais técnicas convencionais, tais como, Rugai, Mattos e Brisola e Kato-Katz/*Helm-Test*. Nesta condição, uma amostra foi conseguida em separado em frasco coletor universal, mais exatamente no último dia (terceiro dia) de coleta da técnica de *TF-Test*.

Após a efetivação de todas as coletas de campo, os voluntários destinaram as amostras às instituições municipais (EMEI e UBS), onde foram recolhidas e encaminhadas para processamento em dois laboratórios localizados na UNICAMP.

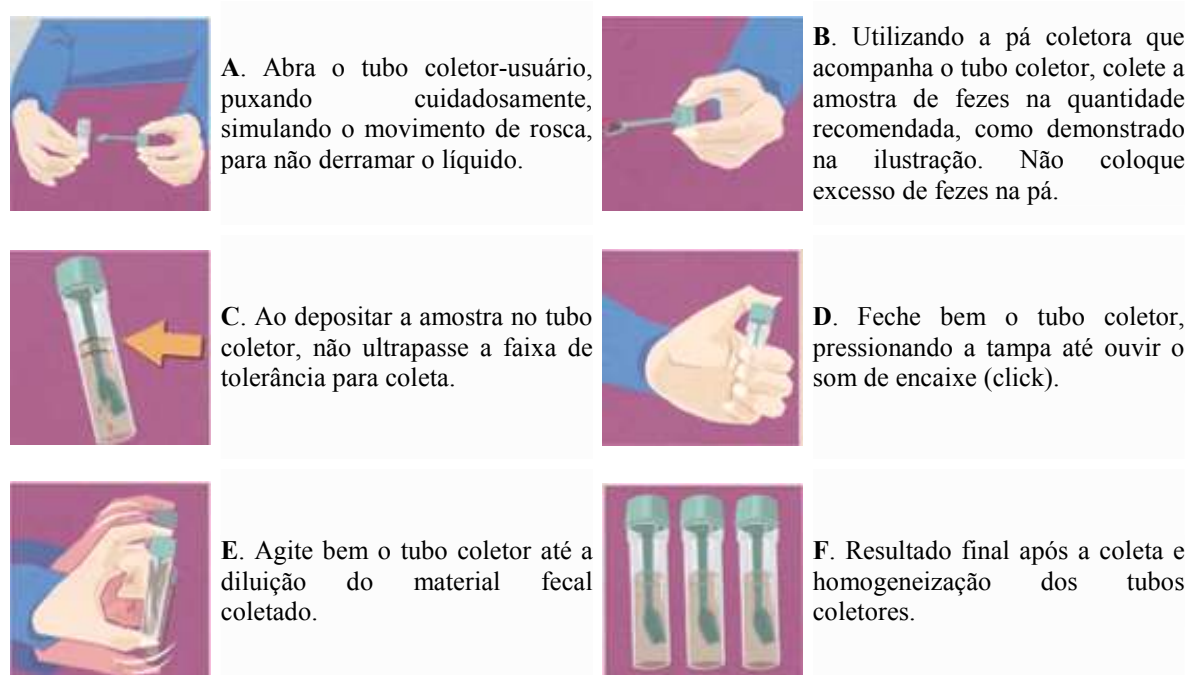


Figura 3: Instruções de coleta das amostras de fezes nos tubos coletores usuário *TF-Test*, segundo recomendação do fabricante (BioBrasil Tecnologia, 2012).

3.3 Laboratórios de Escolha

O processamento do material fecal contido nos tubos coletores *TF-Test* foram realizados no Laboratório de Informática Visual (LIV) em Biomedicina e Saúde do Instituto de Computação (figura 4). As amostras coletadas no frasco coletor universal foram processadas no Laboratório de Helmintologia, localizado no Departamento de Biologia Animal, do Instituto de Biologia da UNICAMP. Os protocolos operacionais de todas as técnicas encontram-se descritos a seguir.

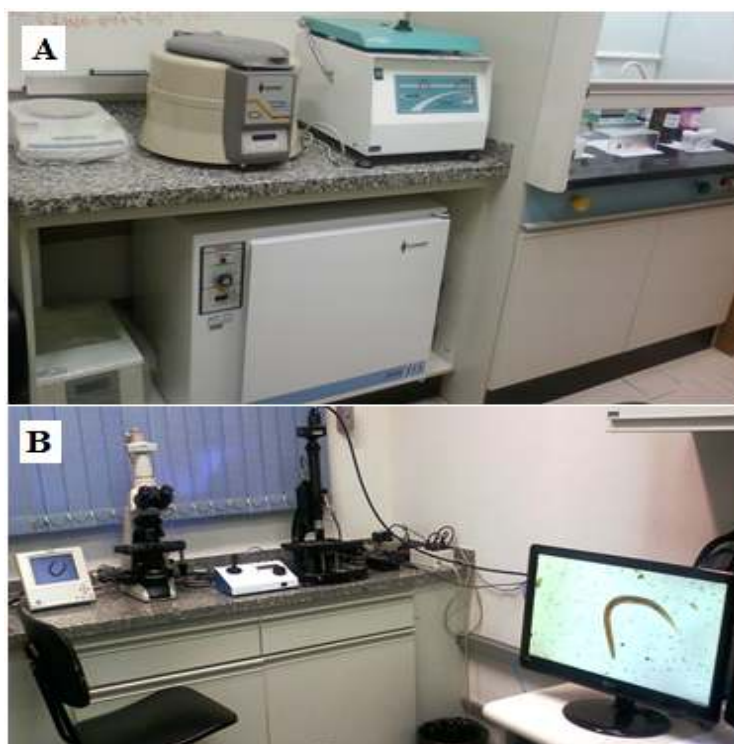


Figura 4: Imagens ilustrativas do LIV em Biomedicina e Saúde, com as seguintes divisões: **A.** Área de equipamentos e processamento laboratorial. **B.** Setor de microscopia óptica e computador.

3.4 Técnicas Parasitológicas

Três técnicas parasitológicas convencionais foram empregadas para avaliar o desempenho diagnóstico da nova técnica parasitológica de *TF-Test Modified*. Haja vista que, na tentativa de suprir reduções de sensibilidade diagnóstica, passamos a utilizar da combinação de três técnicas parasitológicas convencionais comprovadas pela literatura científica. Sendo assim, para o nosso critério de escolha, uma técnica (*TF-Test Conventional*) foi considerada como abrangente, ou geral, sendo eficaz para a detecção de cistos de protozoários e larvas e ovos de helmintos intestinais (HOSHINO-SHIMIZU *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2004; 2006; GOMES, 2008; GOMES, *et al.*, 2008; COELHO *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2012); outra técnica (Rugai, Mattos e Brisola) específica para a detecção de larvas de helmintos (RUGAI *et al.*, 1954); e, por fim, uma última técnica (Kato-Katz / *Helm Test*) foi considerada específica para a determinação de ovos de quatro espécies de helmintos intestinais (KATZ *et al.*, 1970), tais como: *S. mansoni*, *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e Ancilostomídeos.

3.5 Técnica de *TF-Test Conventional* (GOMES *et al.* 2004) e *TF-Test Modified* (FALCÃO *et al.* 2010)

As técnicas parasitológicas de *TF-Test Conventional* e *TF-Test Modified*, utilizando o *kit TF-Test*, foram empregadas para a realização de coleta, homogeneização, preservação, transporte e processamento laboratorial de material fecal.

3.5.1 Apresentação do *Kit TF-Test*

O *kit TF-Test* é constituído por um conjunto de diferentes componentes, ou peças, confeccionados em plásticos recicláveis em polipropileno (figura 5), sendo dois componentes mantidos em laboratório: o conjunto de filtros e tubo de centrifugação; o terceiro componente constituído de três tubos, denominados de tubos coletores usuário, com capacidade de 12 mL de volume cada. No estudo, estes três tubos foram fornecidos aos voluntários para a realização de coleta de material fecal. Externamente aos tubos coletores usuário existem graduações de 1 mL até 10 mL. Cada tubo contém 5 mL de líquido preservador a base de solução neutra de formalina

a 7,5%. Ainda, em cada tubo, externamente, há uma faixa indicando que o nível do líquido preservador não deverá ultrapassá-la, especialmente após a introdução do material fecal. Internamente à tampa do tubo coletor está conectada uma peça plástica em forma de pá (colher), que é utilizada para a coleta de material fecal na proporção de aproximadamente 1,5 g de fezes. No laboratório, os três tubos coletores usuário contendo amostras fecais são acoplados por encaixe em três orifícios de um sistema duplo de filtros, denominado conjunto de filtros, contendo internamente malhas metálicas filtrantes de 400 μm e 200 μm . Ao conjunto já acoplado, de tubos coletores usuário com o sistema de filtros, é conectado um tubo de centrifugação. O tubo de centrifugação apresenta-se na forma de cone, mais precisamente com o fundo em forma de “V”. A montagem dos três tubos coletores usuário, mais conjunto de filtros e tubo de centrifugação vem a constituir o conjunto processador *TF-Test*, utilizado no processamento laboratorial de centrífugo-sedimentação das técnicas parasitológicas de *TF-Test Conventional* e *TF-Test Modified*.

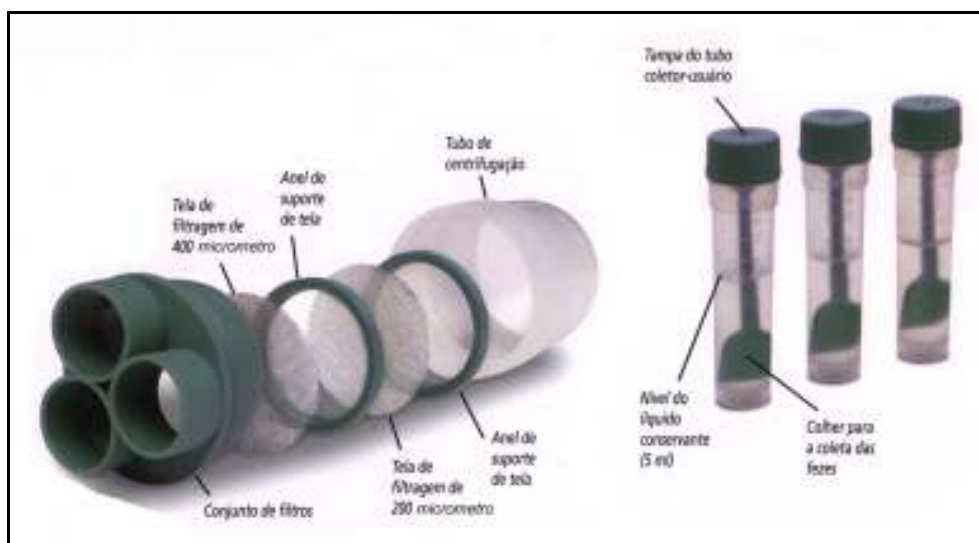


Figura 5: Detalhamento de peças que compõem o *Kit TF-Test*.

3.5.2 Protocolo Operacional da Técnica de *TF-Test Conventional*

a) No laboratório, agitar vigorosamente os tubos coletores usuário contendo as amostras fecais, homogeneizando-as para serem processadas (figura 6A);

- b) Em uma estante própria para a técnica de *TF-Test*, acomodar os três tubos coletores pertencentes a cada voluntário, em separado, com as tampas semi-abertas. Em seguida, adicionar em um dos tubos por vez uma gota de detergente neutro e 3 mL de acetato de etila p.a. (figura 6B);
- c) Fechar os tubos coletores com as suas respectivas tampas, e agitá-los vigorosamente por 30 segundos a fim de obter uma suspensão homogênea de partículas fecais (figura 6C);
- d) Retirar as tampas dos tubos coletores e encaixar os três tubos pertencentes ao mesmo voluntário ao conjunto de filtros, que já contém o tubo de centrifugação acoplado em uma de suas extremidades, de modo a montar o conjunto processador *TF-Test* (figura 6D);
- e) Verificar se o conjunto processador *TF-Test* não apresenta nenhum vazamento de material a ser processado em centrífuga, fazendo para isto a inversão de todo o conjunto (figura 6E);
- f) Centrifugar o conjunto processador *TF-Test* por um minuto, a 500 g (1.500 rpm), a depender do rotor do equipamento (centrífuga), tendo os três tubos coletores voltados para a parte superior da caçapa e o tubo de centrifugação voltado para a parte inferior da caçapa. A caçapa utilizada é a de 100 mL universal (figura 6F);
- g) Após a centrifugação, desacoplar cuidadosamente do restante das peças do conjunto processador o tubo de centrifugação, colocando-o na estante *TF-Test*, descartando o restante das peças em recipiente apropriado para material sólido contaminante (figura 6G);
- h) Decantar o líquido sobrenadante do tubo de centrifugação em recipiente apropriado para descarte de líquido contaminante, conforme as normas de biossegurança (figura 6H);
- i) Adicionar cerca de 10 gotas de solução salina fisiológica (NaCl a 0,85%) sobre o sedimento formado no fundo do tubo de centrifugação, ressuspendendo-o e homogeneizando-o delicadamente com o auxílio de pipeta plástica descartável (figura 6I);
- j) Com a mesma pipeta, transferir uma ou duas gotas do material processado (suspensão fecal) sobre uma lâmina de microscopia (figura 6J);
- k) Adicionar, sobre a(s) gota(s), uma gota de solução de Lugol diluído, e mais uma gota de solução salina fisiológica (figura 6K); e
- l) Preparar, em seguida, um esfregaço de todo o material sobre a lâmina. Cobrir o esfregaço com lamínula e examiná-lo em microscopia de luz convencional com aumentos de 100 e 400 vezes (figura 6L).



A. Agite os três tubos coletores usuário para homogeneização do material fecal coletado.



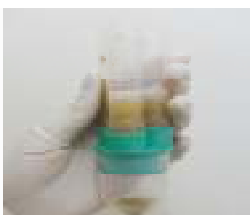
B. Acomodar os três tubos na estante *TF-Test*, com as tampas semi-abertas, e adicionar uma gota de detergente neutro e 3 mL de acetato de etila p.a. em cada tubo.



C. Fechar os tubos coletores e agitar vigorosamente por 30 segundos.



D. Retirar as tampas e encaixar os tubos ao conjunto de filtros, que já contém o tubo de centrifugação acoplado em uma de suas extremidades.



E. Verificar se o conjunto processador não apresenta vazamento, por inversão de todo o conjunto.



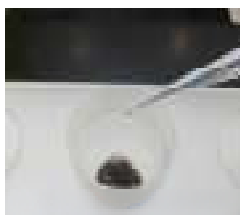
F. Centrifugar o conjunto processador por um minuto, a 1.500 rpm (500 g).



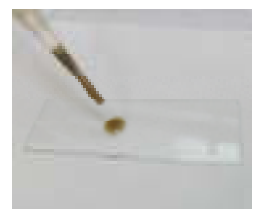
G. Após a centrifugação, desacoplar do restante das peças do conjunto processador o tubo de centrifugação.



H. Decantar o líquido sobrenadante do tubo de centrifugação.



I. Adicionar cerca de 10 gotas de solução fisiológica sobre o sedimento, e ressuspender e homogeneizar com uma pipeta até a formação de uma suspensão fecal.



J. Transferir uma ou duas gotas do material processado (suspensão) sobre uma lâmina de microscopia.



K. Sobre esta gota, adicionar uma gota de solução de Lugol diluído e mais uma gota de solução salina fisiológica.



L. Fazer um esfregaço de todo o material sobre a lâmina, cobrir o com lamínula e examinar ao microscópio.

Figura 6: Protocolo operacional da técnica de *TF-Test Conventional*.

3.5.3 Protocolo Operacional da Técnica *TF-Test Modified*

O protocolo operacional da técnica parasitológica de *TF-Test Modified* tem início logo após o processamento laboratorial de centrífugo-sedimentação da técnica de *TF-Test Conventional*, apresentando duas etapas, a saber: a) flutuação-espontânea para detecção de estruturas leves (< 1,17 g/mL), como exemplo, cistos e oocistos de protozoários e ovos leves de helmintos intestinais; e b) sedimentação-espontânea com eliminação de impurezas fecais, para a detecção de estruturas denominadas pesadas (> 1,17 g/mL).

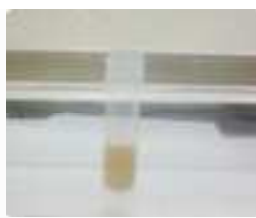
3.5.3.1 Flutuação-espontânea para detecção de cistos e oocistos de protozoários e ovos leves de helmintos (< 1,17 g/mL)

- a) Ao término do processamento laboratorial de centrífugo-sedimentação da técnica de *TF-Test Conventional*, a suspensão do tubo cônico de centrifugação (figura 7A), contendo cerca de 600 µl de sedimento fecal e solução fisiológica, é homogeneizada e separada em duas partes em tubos apropriados, cada qual contendo cerca de 300 µl de suspensão fecal. Convém mencionar que a separação e transferência desta suspensão para os dois tubos devem ser praticadas com auxílio de uma pipeta plástica descartável ou similar (figura 7A);
- b) Na efetiva etapa do protocolo operacional da técnica de *TF-Test Modified*, um desses tubos é empregado para o processamento laboratorial. A este tubo, adiciona-se na suspensão 3 mL de solução saturada de sulfato de zinco, com densidade específica de 1,17g/ml, e todo este material é homogeneizado por 30 segundos (figura 7B);
- c) Em seguida, o tubo é completado com a mesma solução reagente (sulfato de zinco), de modo a permitir a formação de um menisco na sua borda (figura 7C);
- d) Logo após, uma lâmina de microscopia é colocada sobre o menisco, de forma a ficar em contato com a suspensão fecal (figura 7D);
- e) Um tempo de 15 minutos é aguardado e, logo após, a lâmina é retirada da borda do tubo, com um movimento brusco de inversão, e colocada em um local apropriado. Uma película de suspensão é formada na região central da lâmina após inversão (figura 7E);
- f) Sobre esta película adiciona-se uma gota de solução corante à base de Lugol (figura 7F);
- g) Após, é feito um esfregão na suspensão (figura 7G);

- h) Nesta suspensão é sobreposta uma lamínula de 22mm x 22mm de dimensional (figura 7H);
- i) Por fim, lâmina e lamínula são conduzidas ao microscópio para análise (figura 7I).



A. A suspensão do tubo cônico é homogeneizada e separada em duas partes (dois tubos apropriados).



B. Em um dos tubos, adiciona-se a suspensão 3 mL de solução saturada de sulfato de zinco, e homogeneiza-se este material por 30 segundos.



C. Todo o tubo é completado com a mesma solução saturada (sulfato de zinco), de modo a formar um menisco na sua borda.



D. Uma lâmina de microscopia é colocada sobre o menisco.



E. Após 15 minutos, a lâmina é retirada da borda do tubo, com um movimento brusco de inversão.



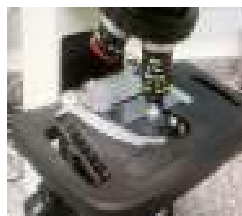
F. Sobre esta película de suspensão adiciona-se uma gota de solução corante à base de Lugol.



G. Um esfregaço é feito na película sobreposta a lâmina.



H. Sobre este esfregaço coloca-se uma lamínula de 22mm x 22mm de dimensional



I. A lâmina e lamínula são conduzidas ao microscópio para a efetivação de análise.

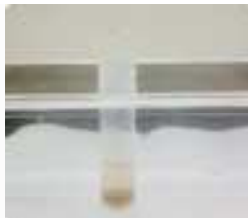
Figura 7: Protocolo operacional da técnica de *TF-Test Modified*, na etapa de flutuação-espontânea para a detecção de estruturas leves ($< 1,17 \text{ g/mL}$).

3.5.3.2 Sedimentação-espontânea para detecção de ovos pesados (> 1,17 g/mL) e larvas de helmintos

- a) Para a execução desta etapa de protocolo operacional é empregado o outro tubo com cerca de 300µl de suspensão fecal. A este tubo adiciona-se 3 gotas de uma solução reagente denominada de composto, que é formada por hipoclorito de sódio, hidróxido de sódio, cloreto de sódio e água com teor de cloro ativo. Esta suspensão é homogeneizada por 30 segundos e ficará em repouso por um tempo de 5 minutos, momento em que este material adquire uma coloração clarificada (figura 8A);
- b) Logo após, a este meio, são adicionadas 3 mL de solução neutra de formalina. Todo o material é novamente homogeneizado (figura 8B);
- c) Em seguida, 3 mL de acetato de etila p.a. são adicionados ao material preparado em item anterior. Uma nova homogeneização é estabelecida, desta vez de forma vigorosa, por um tempo de 30 segundos (figura 8C);
- d) O tubo contendo toda a suspensão homogeneizada ficará em repouso em uma estante apropriada *TF-Test*, por um tempo de 15 minutos, até que grande parte das impurezas fecais venham a flutuar por diferença de densidade específica, mantendo as estruturas parasitárias na parte inferior do tubo, onde deve ficar localizado parte do material fecal sedimentado a ser analisado (figura 8D);
- e) O sobrenadante é retirado cuidadosamente, sempre de cima para baixo com o uso de pipeta plástica descartável ou similar, de modo a deixar 0,5 ml da suspensão fecal no tubo (figura 8E);
- f) Logo após, 4 gotas de solução fisiológica são adicionadas a suspensão fecal e, em seguida, todo o material é novamente homogeneizado, com o uso de pipeta plástica descartável ou similar, através de movimentos bruscos de sucção e ejeção do meio (figura 8F);
- g) Após, com o emprego da mesma pipeta plástica, duas gotas da suspensão são sugadas e conduzidas a uma lâmina de microscopia (figura 8G);
- h) Na sequência, sobre as gotas localizadas na lâmina de microscopia é adicionada uma gota de solução corante a base de Lugol. Este corante é preparado com água glicerinada, na proporção de 12 volumes/gotas desta água (6 volumes de água tratada para 2 volumes de glicerina - glicerol ou propano-1,2,3-triol - tamponada) para 8 volumes/gotas de Lugol (figura 8H); e
- i) Um esfregaço fecal é realizado no material sobreposto a lâmina de microscopia. Por último, lâmina e lamínula são conduzidas ao microscópio para análise (figura 8I).



A. 3 gotas da solução composto são adicionadas a suspensão fecal. Logo após, todo meio é homogeneizado por 30 segundos e deixado em repouso por um tempo de 5 minutos.



B. 3 mL de solução neutra de formalina são adicionados a suspensão. Uma nova homogeneização é realizada manualmente.



C. Na efetiva suspensão fecal são adicionados 3 mL de acetato de etila p.a. Nova homogeneização, desta vez vigorosa, de 30 segundos é aplicada ao meio.



D. Deixar o tubo em repouso por 15 minutos.



E. Decantar o sobrenadante de cima para baixo, deixando cerca de 0,5 mL da suspensão fecal no tubo.



F. Adicionar 4 gotas de solução salina fisiológica e homogeneizar o material fecal.



G. Com auxílio de pipeta plástica descartável, duas gotas da suspensão são sugadas e conduzidas a uma lâmina de microscopia.



H. Sobre as duas gotas, adicionar uma gota de Lugol



I. Um esfregaço fecal é realizado no material sobreposto a lâmina de microscopia. Seguida conduzido ao microscópio para análise.

Figura 8: Protocolo operacional da técnica de *TF-Test Modified*, na etapa de sedimentação-espontânea para a detecção de ovos pesados ($> 1,17$ g/mL) e larvas de helmintos.

3.6 Técnica de Rugai, Mattos e Brisola (1954)

- a) A tampa do recipiente que acondiciona as fezes é retirada e, em seguida, o restante do recipiente contendo fezes é envolvido por uma gaze dobrada em até quatro vezes, de modo a dar forma a uma pequena "trouxa";
- b) Esta pequena trouxa, com a abertura do recipiente voltada para baixo, é colocada na parte superior de um cálice de vidro para sedimentação, contendo água aquecida (45°C) e em volume suficiente para entrar em contato com as fezes;
- c) Deixar uma hora em repouso;
- d) Sugar parte do material depositado no fundo do cálice, com a ajuda de uma pipeta, e transportar para uma lâmina de microscopia.
- e) Por último, uma gota de corante Lugol é adicionada ao material fecal sobreposto em lâmina,

3.7 Técnica de Kato (1954), Modificado por Katz e cols. (1970) e atualizado como *Helm-Test* (FIOCRUZ, 2008)

3.7.1 Técnica de *Helm-Test* (FIOCRUZ, 2008)

- a) Retirar uma amostra de fezes com o auxílio da espátula e colocar sobre um papel absorvente;
- b) Depositar sobre as fezes o filtro TEST, comprimindo-a com o auxílio da espátula que fará com que parte das fezes passe através das malhas;
- c) Usar o outro lado da espátula para recolher as fezes que passarem pelas malhas e depositar no orifício da placa perfurada que já deverá estar sobre uma lâmina de vidro de microscopia.
- d) Comprimir as fezes no orifício da placa perfurada até que esteja cheio;
- e) Passar a lateral da espátula sobre a placa perfurada para retirar o excesso de fezes. Jogar fora a espátula e o filtro TEST;
- f) Levantar, inclinando inicialmente uma das extremidades da placa perfurada e retirá-las de modo a ficar sobre a lâmina de vidro um cilindro do material fecal. Jogar fora a placa perfurada;
- g) Colocar sobre o cilindro de fezes a lamínula pré-colorida;
- h) Após ter colocado a lamínula sobre o cilindro de fezes, inverter a preparação sobre uma

superfície lisa e fazer pressão com o polegar sobre a região onde se encontra o cilindro de fezes, de modo que o material se espalhe uniformemente entre a lâmina e a lamínula. Evitar que as fezes extravasem;

- i) Deixar a preparação em repouso por 60 minutos à temperatura ambiente;
- j) Levar a preparação ao microscópio para observação e contagem de ovos de helmintos.

3.8 Critério de Escolha de Solução Corante

Em rotina laboratorial, várias colorações são empregadas, mesmo que ovos e larvas de helmintos possam ser diagnosticados sem o uso de coloração. No entanto, os diferentes estágios apresentados pelos protozoários do trato intestinal indicam a necessidade de utilização de diferentes colorações. Várias são as colorações designadas para a preparação e o exame de esfregaços fecais, como exemplo, para cistos e trofozoítos de protozoários. As colorações temporárias a base de iodo são recomendadas para corar helmintos e cistos de protozoários (GARCIA, 2009). No entanto, estas colorações não são aconselhadas aos estágios vegetativos de protozoários. Nesta condição, a literatura recomenda o emprego de colorações permanentes, tais como: hematoxilina férrica, segundo Heidenhain; tricrômico de Wheatley, etc (GARCIA, 2009).

Devido ao fato de realizarmos o encontro de estruturas císticas de protozoários, além de larvas e ovos de helmintos, demos preferência em utilizar no nosso estudo o corante à base de iodo, mais especificamente o Lugol. De acordo com Hoshino-Shimizu e colaboradores (2003) e Garcia (2009), o corante Lugol pode ser usado para a detecção de cistos de protozoários, desde que alguns critérios sejam estabelecidos, como: a) os organismos parasitos sejam corretamente coletados; b) que mais de um cisto seja identificado por campo de lâmina de microscopia, de maneira a possibilitar a repetição dos casos para a correta diagnose; e, por fim, c) que as confirmações diagnósticas sejam feitas por especialistas com experiência suficiente, por meio de identificações morfométricas (cistos e núcleos, p.ex.), maturidade dos cistos, localização de cariossomo, ou endossomo, etc. Estes autores ainda sugerem que “o tamanho e a forma dos cistos, o número de núcleos e sua morfologia, presença de corpos cromatóides (quando presentes) e de inclusões de glicogênio (no citoplasma) servem para identificá-los. Se bem que a coloração pelo Lugol seja suficiente para o diagnóstico destes cistos, estes podem ser fixados e corados pela hematoxilina para o exame mais acurado.

3.9 Controle de Qualidade e Biossegurança

Para a realização do efetivo trabalho, durante as etapas de coleta, homogeneização, preservação, transporte e processamento laboratorial de amostras fecais, foram tomados os cuidados que estão descritos na embalagem plástica do *Kit TF-Test* e, bem como também, no protocolo operacional das demais técnicas parasitológicas convencionais. Ademais, foram obedecidos todos os critérios de segurança para a realização de processamento laboratorial das técnicas parasitológicas, como por exemplo, descarte de materiais sólidos e líquidos tóxicos em recipientes apropriados, para posterior incineração, de modo a respeitar as normas de Biossegurança e Controle de Qualidade.

3.10 Análises de Resultados

O avanço de conhecimentos tem permitido o desenvolvimento e validação de novas técnicas destinadas ao diagnóstico laboratorial. Entretanto, e especialmente visando permitir a implantação de técnicas de alta eficácia diagnóstica, estas deverão passar por um processo adequado de avaliação de desempenho estatístico, de maneira a permitir o diagnóstico verdadeiro, em que os agentes causadores da doença são perfeitamente demonstrados.

Desta forma, os resultados obtidos neste estudo foram avaliados estatisticamente, mais exatamente por comparações com os resultados obtidos pelas técnicas parasitológicas de *TF-Test Modified*, *TF-Test Conventional*, Rugai, Mattos & Brisola e Kato-Katz/*Helm Test*, determinando para isto alguns parâmetros, como sensibilidade e especificidade (GALEN & GAMBINO, 1975), intervalo de confiança (ROTHMAN & BOYCE, 1982), concordância *Kappa* e sua classificação (MACLURE & WILLET, 1987), tais como: *Quase Perfeita* (0,81 a 1,00), *Substancial* (0,61 a 0,80), *Moderada* (0,41 a 0,60), *Fraca* (0,21 a 0,40) e *Pobre* ou *Ruim* (0 a 0,20).

Assim, os cálculos empregados para a determinação de tais parâmetros seguem logo abaixo:

		Diagnóstico Verdadeiro		
TÉCNICA		+	-	
	+	a	b	e
	-	c	d	f
A		g	h	i

Parâmetros Diagnósticos

Sensibilidade = a/g

Especificidade = d/h

Eficiência = $(a + d) / i$

Valor Preditivo Positivo = a/e

Valor Preditivo Negativo = c/f

Falso Positivo = $1 - \text{especificidade}$

Falso Negativo = $1 - \text{sensibilidade}$

Índice *kappa* = $(Po - Pc) / (1 - Pc)$

$Po = (a + d)/i$

$Pc = [(e \cdot g) + (f \cdot h)] / i^2$

Figura 9: Fórmulas utilizadas para avaliação da performance diagnóstica das técnicas parasitológicas.

4. RESULTADOS

Para a realização do projeto proposto, foram obtidas amostras de fezes de 457 voluntários, as quais foram processadas por quatro diferentes técnicas parasitológicas, que resultou na totalização de 1.828 exames. A taxa de positividade geral para voluntários infectados foi de 43,33% (198/457). Dentre as espécies parasitárias diagnosticadas, helmintos e protozoários intestinais foram detectados em 42,23% (193/457) de voluntários pela nova técnica de *TF-Test Modified*. Destes casos, grande parte demonstrou ser portadores de infecções com monoparasitismo, apresentando 54,40% (105/193) de infecção simples. Esta técnica parasitológica, quando comparada com as demais técnicas, apresentou alto valor de infecção, como exemplo, para dupla, tripla e múltipla, de maneira a perfazer um total de 98,37% (303/308) de infecções.

Por sua vez, a técnica *TF-Test Conventional* detectou parasitismo em 36,76% (168/457) dos voluntários, sendo 58,33% (98/168) destes diagnosticados com uma única espécie parasitária. Esta técnica também demonstrou elevado valor de tipo de infecção, com percentual de 83,12% (256/308).

A técnica parasitológica de Kato-Katz/*Helm-Test* em 23 situações encontrou estruturas helmínticas, o que fez corresponder em 100% de voluntários monoparasitados. Esta técnica demonstrou somente o tipo de infecção simples, e o seu valor total de infecção não ultrapassou a 07,47% (23/308). Por último, a técnica de Rugai, Mattos e Brisola identificou 19 tipos de infecções, repercutindo em 100% dos voluntários com o tipo de infecção simples. Como para a técnica anterior, esta técnica parasitológica apresentou baixo valor total de infecção, que não superou a 06,69% (19/308) (tabela 1).

Técnica	Indivíduos Infectados		Tipo de Infecção				Total de Infecção
	Nº	(%)	Simples	Dupla	Tripla	Múltipla	Nº
<i>TF-Test Modified</i>	193	(42,23)	105	70	15	3	303
<i>TF-Test Conventional</i>	168	(36,76)	98	54	14	2	256
Kato-Katz / <i>Helm Test</i>	23	(5,03)	23	0	0	0	23
Rugai, Mattos e Brisola	19	(4,16)	19	0	0	0	19
Total das técnicas	198	(43,33)	108	72	15	3	308

Tabela 1: Positividade e tipo de infecção apresentada no estudo de 457 indivíduos por quatro diferentes técnicas parasitológicas.

A detecção parasitária, 14 espécies foram identificadas, sendo 6 relativas a protozoários e 8 consideradas como helmintos (tabela 2). Na somatória total, as quatro técnicas parasitológicas diagnosticaram 308 estruturas parasitárias. Destas, 303 foram identificadas pela técnica de *TF-Test Modified*, 256 pela técnica de *TF-Test Conventional*, 23 por Kato-Katz/*Helm-Test* e 19 por Rugai, Mattos e Brisola.

As quatro técnicas parasitológicas foram capazes de detectar 67,86% (209) de estruturas císticas de protozoários, ante 32,14 % (99) de estruturas helmínticas, dentre ovos e larvas. Entre as 6 espécies de protozoários, a técnica de *TF-Test Modified* superou as demais técnicas na identificação de quatro espécies, atingindo um valor percentual de 56,82% (175/308), se igualando a uma outra técnica (*TF-Test Conventional*) na detecção de duas outras espécies, em que ambas apresentaram 09,74% (30/308) de detecção (tabela 2).

Já para o encontro de helmintos da luz intestinal, para sete espécies identificadas, a técnica de *TF-Test Modified* mostrou superioridade diagnóstica de 30,52% (94/308), tornando-se igual à outra técnica (*TF-Test Conventional*) no encontro de uma espécie parasitária (01,30% - 04/308) (tabela 2). Apesar de a técnica de Kato-Katz/*Helm-Test* ser específica, sobremaneira, para a recuperação quantitativa de ovos de *S. mansoni*, a técnica de *TF-Test Modified* superou esta técnica de forma qualitativa na detecção destes ovos, mais exatamente no encontro de 14 (04,54% - 14/308) destas estruturas, contra 9 (02,92% - 09/308) da técnica específica (Kato-Katz/*Helm-Test*).

O mesmo comentário anterior prevaleceu para a identificação de larvas de nematoides intestinais, *S. stercoralis*, em que a técnica de *TF-Test Modified* superou a técnica específica de

Rugai, Mattos e Brisola, mais exatamente no encontro de 25 larvas em oposição a 19 larvas, propriamente.

Espécies Parasitárias	<i>TF-Test Modified</i>		<i>TF-Test Conventional</i>		Kato-Katz		RMB		Total	
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
Protozoários										
<i>Blastocystis hominis</i>	84	18,38	61	13,35	NA	-	NA	-	84	18,38
<i>Entamoeba coli</i>	35	7,66	34	7,44	NA	-	NA	-	36	7,88
<i>Endolimax nana</i>	42	9,19	41	8,97	NA	-	NA	-	43	9,41
<i>Iodamoeba butschlii</i>	5	1,09	5	1,09	NA	-	NA	-	5	1,09
<i>Giardia duodenalis</i>	25	5,47	25	5,47	NA	-	NA	-	27	5,91
<i>Entamoeba histolytica/E.dispar</i>	14	3,06	12	2,63	NA	-	NA	-	14	3,06
Helmintos										
<i>Ascaris lumbricoides</i>	21	4,60	20	4,38	12	2,63	NA	-	21	4,60
<i>Trichuris trichiura</i>	7	1,53	5	1,09	1	0,22	NA	-	7	1,53
Ancilostomatídeos	12	2,63	8	1,75	-	-	NA	-	12	2,63
<i>Strongyloides stercoralis</i>	25	5,47	22	4,81	NA	-	19	4,16	26	5,69
<i>Schistosoma mansoni</i>	14	3,06	10	2,19	9	1,97	NA	-	14	3,06
<i>Hymenolepis nana</i>	2	0,44	1	0,22	-	-	NA	-	2	0,44
<i>Enterobius vermicularis</i>	13	2,84	8	1,75	-	-	NA	-	13	2,85
<i>Taenia</i> spp.	4	0,88	4	0,88	1	0,22	NA	-	4	0,88
Total	303	66,30	256	56,02	23	5,03	19	4,16	308	67,41

Tabela 2: Espécies parasitárias detectadas no estudo de 457 indivíduos por quatro técnicas parasitológicas.

NA: Não se aplica.

RMB: Rugai, Mattos e Brisola.

A avaliação do desempenho diagnóstico das quatro técnicas parasitológicas para sensibilidade, eficiência e especificidade foi realizada comparativamente de forma abrangente (helmintos e protozoários) e específica (*S. stercoralis* e *S. mansoni*). De maneira abrangente, foram avaliadas as técnicas de *TF-Test Modified* e *TF-Test Conventional* na obtenção de catorze (14) espécies parasitárias (tabela 2), dentro de protozoários e helmintos intestinais. Por outro lado, de forma específica, foram avaliadas as duas técnicas de *TF-Test* com as técnicas de Kato-Katz/*Helm-Test* e Rugai, Mattos e Brisola, mais precisamente às detecções de ovos de *S. mansoni*, *A. lumbricoides*, Ancilostomatídeos, *H. nana*, *E. vermicularis*, *T. trichiura* e *Taenia* spp., e larvas de *Strongyloides stercoralis*, respectivamente (tabelas 4 e 5).

Na avaliação ampla, a técnica de *TF-Test Modified*, quando comparada com *TF-Test Conventional*, demonstrou alta sensibilidade diagnóstica de 98,38%, superando a técnica convencional em 15,26% (98,38% - 83,12%). Em termos de eficiência, a superioridade diagnóstica permaneceu para a nova técnica em 10,28% (98,90% - 88,62%). As especificidades foram de 100% (149/149) para ambas as técnicas.

Técnica	Sensibilidade	Eficiência	Especificidade
<i>TF-Test Modified</i>	98,38% (303/308)	98,90% (452/457)	100% (149/149)
<i>TF-Test Conventional</i>	83,12% (256/308)	88,62% (405/457)	100% (149/149)

Tabela 3: Performance diagnóstica de duas técnicas parasitológicas no estudo de 457 indivíduos.

Na avaliação específica para a detecção de larvas de *S. stercoralis*, três técnicas foram empregadas de maneira qualitativa, tais como: *TF-Test Modified*, *TF-Test Conventional* e Rugai, Mattos e Brisola (tabela 4). Em termos de sensibilidade diagnóstica, a técnica de *TF-Test Modified* se sobressaiu sobre as outras duas técnicas convencionais, sobretudo ao apresentar 96,15% de sensibilidade, ante 84,15% e 73,08% de *TF-Test Conventional* e Rugai, Mattos e Brisola, respectivamente. As eficiências demonstradas pelas três técnicas estiveram muito próximas, com 99,78% para *TF-Test Modified*, 99,12% para *TF-Test Conventional* e 98,46% para Rugai, Mattos e Brisola. Ademais, da mesma forma da tabela anterior (tabela 3), a especificidade foi de 100% para as três técnicas, haja vista que, todas conseguiram detectar larvas do nematoide *S. stercoralis* (431/431).

Técnica	Sensibilidade	Eficiência	Especificidade
<i>TF-Test Modified</i>	96,15% (25/26)	99,78% (456/457)	100% (431/431)
<i>TF-Test Conventional</i>	84,15% (22/26)	99,12% (453/457)	100% (431/431)
Rugai, Mattos e Brisola	73,08% (19/26)	98,46% (450/457)	100% (431/431)

Tabela 4: Performance diagnóstica de três técnicas parasitológicas na pesquisa de *S. stercoralis* em um estudo com 457 indivíduos.

Uma segunda avaliação foi realizada de forma específica, todavia, para o encontro de forma qualitativa de ovos de *S. mansoni*. Nesta condição, três técnicas foram empregadas, como exemplo: *TF-Test Modified*, *TF-Test Conventional* e Kato-Katz/*Helm-Test*. Segundo tabela 5, a nova técnica de *TF-Test Modified*, amparada no padrão ouro (somatória de todas as técnicas),

apresentou 100% (14/14) de sensibilidade diagnóstica, contra 71,42% (10/14) de *TF-Test Conventional* e 64,28% (9/14) de *Kato-Katz/Helm-Test*. Em análogo à avaliação anterior (tabela 4), as eficiências apresentadas por estas técnicas ficaram muito próximas, ou seja: 100% (457/457) para *TF-Test Modified*; 99,12% (453/457) para *TF-Test Conventional*; e 98,90% (452/457) para *Kato-Katz/Helm-Test*. Outrossim, como para as condições anteriores, a especificidade foi de 100% (443/443) para todas as técnicas.

Técnica	Sensibilidade	Eficiência	Especificidade
<i>TF-Test Modified</i>	100% (14/14)	100.0% (457/457)	100% (443/443)
<i>TF-Test Conventional</i>	71,42% (10/14)	99,12% (453/457)	100% (443/443)
<i>Kato-Katz / Helm Test</i>	64,28 (9/14)	98,90% (452/457)	100% (443/443)

Tabela 5: Desempenho diagnóstico de três técnicas parasitológicas na pesquisa de *S. mansoni* em um estudo com 457 indivíduos.

Conforme já comentado nesta seção (5. Resultados), para a avaliação do desempenho diagnóstico da nova técnica parasitológica foram considerados outros parâmetros, como exemplo: valores preditivos positivos e negativos; e resultados falsos positivos e falsos negativos (tabela 6). De maneira ampla, foram avaliadas comparativamente as técnicas de *TF-Test Modified* e *TF-Test Conventional*, apresentando alto valor preditivo positivo de 100%. No entanto, quando visto de forma negativa, o valor preditivo para *TF-Test Modified* foi mais seguro ao demonstrar 3,25% (5/154) em oposição a 25,87% (52/201) da técnica convencional de *TF-Test*. O valor falso positivo foi idêntico a ambas as técnicas, ou seja, de 0% (1 - 1), o que não prevaleceu ao falso resultado negativo, em que a nova técnica parasitológica se mostrou mais segura, sendo 15,26% (16,88% - 1,62%) mais eficaz no resultado diagnóstico.

Técnica	Valor Preditivo Positivo	Valor Preditivo Negativo	Falso Resultado Positivo	Falso Resultado Negativo
<i>TF-Test Modified</i>	100% (303/303)	3,25% (5/154)	0% (1-1)	1,62% (1 - 0,9838))
<i>TF-Test Conventional</i>	100% (256/256)	25,87% (52/201)	0% (1-1)	16,88% (1- 0,8312)

Tabela 6: Análise de valores preditivos de resultados positivos e resultados negativos e resultados falsos positivos e falsos negativos das técnicas de *TF-Test Modified* e *TF-Test Conventional* no encontro de helmintos e protozoários intestinais.

Idêntico à tabela 6, a avaliação do desempenho diagnóstico foi realizada de maneira específica à identificação de outra espécie parasitária, mais precisamente para larvas de *S. stercoralis*, com o emprego de três técnicas parasitológicas, a saber: *TF-Test Modified*; *TF-Test Conventional* e Rugai, Mattos e Brisola (tabela 7). O valor preditivo positivo mostrou-se análogo para as três técnicas (100%), porém, o valor negativo apresentou-se desigual para estas técnicas, notavelmente ao indicar 0,23% (1/432) para a técnica de *TF-Test Modified*, 0,92% (4/435) para *TF-Test Conventional*, e 1,60% (7/438) para Rugai, Mattos e Brisola. Por sua vez, os resultados falsos positivos tiveram valores semelhantes para as três técnicas (100%), enquanto que os resultados falsos negativos foram mais consistentes para a técnica de *TF-Test Modified*, que mostrou baixa variação negativa de 3,85% (1 - 0,9615), em restrição a valores negativos de 15,85% (1 - 0,8415) e 26,92% (1 - 0,7308) das técnicas de *TF-Test Conventional* e Rugai, Mattos e Brisola.

Técnica	Valor Preditivo Positivo	Valor Preditivo Negativo	Falso Resultado Positivo	Falso Resultado Negativo
<i>TF-Test Modified</i>	100% (25/25)	0,23% (1/432)	0 % (1 - 1)	3,85% (1 - 0,9615)
<i>TF-Test Conventional</i>	100% (22/22)	0,92% (4/435)	0 % (1 - 1)	15,85% (1 - 0,8415)
Rugai, Mattos e Brisola	100% (19/19)	1,60% (7/438)	0 % (1 - 1)	26,92% (1 - 0,7308%)

Tabela 7: Análise de valores preditivos de resultados positivos e negativos e resultados falsos positivos e falsos negativos das técnicas de *TF-Test Modified*, *TF-Test Conventional* e Rugai, Mattos e Brisola, no diagnóstico específico de larvas de *S. stercoralis*.

Do mesmo modo da tabela 7, a avaliação do desempenho diagnóstico foi realizada de maneira específica à identificação qualitativa de outra espécie parasitária, nesta condição para ovos de *S. mansoni*, pela utilização de três técnicas parasitológicas, a saber: *TF-Test Modified*; *TF-Test Conventional* e Kato-Katz/*Helm-Test* (tabela 8). Nesta circunstância, o valor preditivo positivo se mostrou em igualdade para as três técnicas (100%), entretanto, o valor negativo apresentou ser diferente, especialmente ao designar 0% (0/443) para a técnica de *TF-Test Modified*, 0,89% (4/447) para *TF-Test Conventional*, e 1,12% (5/448) para Kato-Katz/*Helm-Test* (tabela 8). Os resultados falsos positivos tiveram valores idênticos para as três técnicas, ou seja, de 100%, enquanto que o falso resultado negativo foi extremamente estável para a técnica de *TF-Test Modified*, que não mostrou variação negativa, 0% (1 - 1), em restrição a valores negativos de

28,58% (1 - 0,7142) e 35,72% (1 - 0,6428) das técnicas de *TF-Test Conventional* e Kato-Katz/*Helm-Test*, respectivamente.

Técnica	Valor Preditivo Positivo	Valor Preditivo Negativo	Falso Resultado Positivo	Falso Resultado Negativo
<i>TF-Test Modified</i>	100% (14/14)	0,00% (0/443)	0 % (1 - 1)	0 % (1 - 1)
<i>TF-Test Conventional</i>	100% (10/10)	0,89% (4/447)	0 % (1 - 1)	28,58% (1 - 0,7142)
Kato-Katz / <i>Helm-Test</i>	100% (9/9)	1,12% (5/448)	0 % (1 - 1)	35,72% (1 - 0,6428)

Tabela 8: Análise dos valores preditivos de resultados positivos e negativos e resultados falsos positivos e falsos negativos das técnicas de *TF-Test Modified*, *TF-Test Conventional* e Kato-Katz/*Helm-Test*, no diagnóstico qualitativo de ovos de *S. mansoni*.

Como já comentado, para a comparação de dados qualitativos da análise estatística não paramétrica do efetivo estudo foi utilizado o índice *Kappa* (*k*). Este índice foi capaz de indicar o grau de concordância existente entre dados qualitativos, positivos e negativos, obtidos pelas quatro técnicas parasitológicas, que variaram de 0 a 1,0. Quando levado em consideração a eficácia diagnóstica das quatro técnicas para a detecção de todas as espécies parasitárias (tabela 9), a técnica de *TF-Test Modified* apresentou elevado índice *Kappa* (0,975), demonstrou um grau de concordância *Quase Perfeito*, alto índice de concordância (IC) que oscilou de 0,954 a 0,997, quando estimado a 95% ($P < 0,05$), e o valor do desvio padrão (DP) foi de 0,011. Ainda para esta técnica, o número de acordos observados foi de 452 (98,91% das observações), o número de acordos esperados ao acaso foi de 254,4 (55,67% das observações), sendo que, nesta condição a força de acordo foi considerada muito boa.

Na mesma consideração de eficácia diagnóstica, a técnica de *TF-Test Conventional* mostrou moderado índice *Kappa* (0,762), grau de concordância *Substancial*, que variou de 0,703 a 0,822 e com estimativa de 95% ($P < 0,05$), e valor do desvio padrão (DP) foi de 0,030. Além disso, esta técnica indicou um número de acordos observados de 405 (88,62% das observações), um número de acordos esperados ao acaso de 238,1 (52,09% das observações), de modo a resultar em uma força de acordo considerada como boa.

Apesar de serem consideradas específicas para o diagnóstico de poucas espécies parasitárias, sobremaneira dentre helmintos intestinais, as técnicas de Kato-Katz/*Helm-Test* e de Rugai, Mattos e Brisola foram levadas em consideração de forma ampla (helmintos e protozoários intestinais) na tabela 9. Todavia, nas tabelas 10 e 11 estas mesmas técnicas foram

avaliadas de maneira específica, em comparação com as técnicas convencional e modificada de *TF-Test*. De forma abrangente, a técnica de Kato-Katz/*Helm-Test* exibiu baixo índice *Kappa* (0,050), grau de concordância *Ruim*, que alterou de 0,029 a 0,071 a 95% ($P < 0,05$) de estimativa, e valor do desvio padrão foi de 0,011. Ademais, indicou um número de acordos observados de 172 (37,64% das observações), um número de acordos esperados ao acaso de 157,0 (34,35% das observações), e proporcionou uma força de acordo considerada como pobre.

Por sua vez, a técnica parasitológica de Rugai, Mattos e Brisola apresentou fraco índice *Kappa* (0,041), grau de concordância *Ruim*, que variou de 0,022 a 0,060 com estimativa de 95% ($P < 0,05$), e valor do desvio padrão foi de 0,010. Igualmente, mostrou um número de acordos observados de 168 (36,76% das observações), um número de acordos esperados ao acaso de 155,6 (34,05% das observações), o que fez resultar em uma força de acordo considerada como pobre.

Técnica	K	Rank	IC	DP
<i>TF-Test Modified</i>	0,975	<i>Quase Perfeito</i>	(0,954 a 0,997)	0,011
<i>TF-Test Conventional</i>	0,762	<i>Substancial</i>	(0,703 a 0,822)	0,030
Kato-Katz / <i>Helm Test</i>	0,050	<i>Ruim</i>	(0,029 a 0,071)	0,011
Rugai, Mattos e Brisola	0,041	<i>Ruim</i>	(0,022 a 0,060)	0,010

Tabela 9: Eficiência diagnóstica de quatro técnicas parasitológicas, em termos de índice *Kappa*, índice de concordância (IC) com estimativa de 95% e valor DP, no estudo de 457 indivíduos.

A tabela 10 demonstra a eficácia diagnóstica de três técnicas para a detecção qualitativa de uma espécie parasitária, *S. mansoni*. Nesta avaliação, a técnica de *TF-Test Modified* apresentou excelente índice *Kappa* (1,000), mostrou um grau de concordância *Quase Perfeito*, foi preciso no índice de concordância (IC), que oscilou de 1,000 a 1,000 quando estimado a 95% ($P < 0,05$), e o valor do desvio padrão (DP) de 0. Para esta técnica, o número de acordos observados foi de 457 (100,00% das observações), o número de acordos esperados ao acaso foi de 429,9 (94,06% das observações), sendo que, nesta condição a força de acordo foi considerada como perfeita.

Na avaliação da mesma tabela (tabela 10), a técnica de *TF-Test Conventional* exibiu bom índice *Kappa* (0,829), grau de concordância *Quase Perfeito*, índice de concordância (IC) que variou de 0,665 a 0,993, em estimativa de 95% ($P < 0,05$), e o valor do desvio padrão (DP) de 0,084. O número de acordos observados nesta técnica foi de 453 (99,12% das observações), o

número de acordos esperados ao acaso foi de 433,6 (94,88%), e a força de acordo sendo considerada como muito boa.

Por último, ainda no estudo da mesma tabela, a técnica de Kato-Katz/*Helm-Test* alcançou moderado índice *Kappa* (0,777), grau de concordância *Substancial*, índice de concordância que oscilou de 0,588 a 0,967, quando estimado a 95% ($P < 0,05$), e o valor do desvio padrão (DP) de 0,097. Nesta técnica parasitológica, o número de acordos observados foi de 452 (98,91%), o número de acordos esperados ao acaso foi de 434,6 (95,09%), e, por sua vez, a força de acordo foi considerada como boa.

Técnica	K	Rank	IC	DP
<i>TF-Test Modified</i>	1,000	<i>Quase Perfeito</i>	(1,000 a 1,000)	0
<i>TF-Test Conventional</i>	0,829	<i>Quase Perfeito</i>	(0,665 a 0,993)	0,084
Kato-Katz / <i>Helm Test</i>	0,777	<i>Substancial</i>	(0,588 a 0,967)	0,097

Tabela 10: Eficiência diagnóstica de três técnicas parasitológicas no diagnóstico qualitativo de ovos de *S. mansoni*, em termos de índice *Kappa*, índice de concordância com estimativa de 95% e cálculo DP, no estudo de 457 indivíduos.

O final das avaliações de dados qualitativos da análise estatística não paramétrica do efetivo estudo está estampado em tabela 11, que mostra a eficácia diagnóstica de três técnicas parasitológicas para a detecção específica de uma espécie parasitária: *S. stercoralis*. Nesta condição, a técnica de *TF-Test Modified* apresentou elevado índice *Kappa* (0,979), demonstrou um grau de concordância *Quase Perfeito*, alto índice de concordância (IC), que oscilou de 0,939 a 1,000 quando estimado a 95% ($P < 0,05$), e bom valor do desvio padrão (DP) foi de 0,021. Ainda nesta técnica, o número de acordos observados foi de 456 (99,78% das observações), o número de acordos esperados ao acaso foi de 408,8 (89,46% das observações), sendo nesta condição a força de acordo considerada como muito boa.

No estudo comparativo da mesma tabela, a técnica convencional de *TF-Test* exibiu alto índice *Kappa* (0,912), grau de concordância *Quase Perfeito*, elevado índice de concordância (IC), que variou de 0,827 a 0,998, em estimativa de 95% ($P < 0,05$), e o valor do desvio padrão foi de 0,044. O número de acordos observados por esta técnica foi de 453 (99,12%), o número de acordos esperados ao acaso foi de 411,5 (90,04%), e a força de acordo foi considerada como muito boa.

Ainda no estudo da mesma tabela, a técnica convencional e específica de Rugai, Mattos e Brisola alcançou bom índice *Kappa* (0,837), grau de concordância *Quase Perfeito*, índice de concordância (IC) que oscilou de 0,718 a 0,955, quando estimado a 95% ($P < 0,05$), e o valor do desvio padrão foi de 0,060. Por último, esta técnica mostrou um número de acordos igual a 450 (98,47%), um número de acordos esperados ao acaso de 414,2 (90,63%), e força de acordo considerada como muito boa.

Técnica	K	Rank	IC	DP
<i>TF-Test Modified</i>	0,979	<i>Quase Perfeito</i>	(0,939 a 1,000)	0,021
<i>TF-Test Conventional</i>	0,912	<i>Quase Perfeito</i>	(0,827 a 0,998)	0,044
Rugai, Mattos e Brisola	0,837	<i>Quase Perfeito</i>	(0,718 a 0,955)	0,060

Tabela 11: Eficiência diagnóstica de três técnicas parasitológicas no diagnóstico de *S. stercoralis* em termos de índice *Kappa*, índice de concordância com estimativa de 95% e cálculo DP, no estudo de 457 indivíduos.

5. DISCUSSÃO

O avanço de conhecimentos tem proporcionado o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico laboratorial. Entretanto, para a devida aplicação, estas técnicas deverão ser adequadamente avaliadas em termos de desempenho diagnóstico. Vários parâmetros são utilizados para esta finalidade, sendo que, os mais avaliados estariam entre: sensibilidade, especificidade, eficiência, valor preditivo de resultado positivo e de resultado negativo, resultados falsos positivos e falsos negativos. Vale ressaltar que, estes parâmetros são determinados em descrição ao diagnóstico verdadeiro, em que os agentes causadores da doença são demonstrados, como exemplo, para o atual estudo, parasitos.

Tendo em vista objetivar o aumento da sensibilidade no diagnóstico de enteroparasitoses de humanos, e, sobretudo, proporcionar avanços à técnica de *TF-Test Conventional*, avaliamos o desempenho diagnóstico de uma nova técnica (*TF-Test Modified*) em comparação com três técnicas convencionais comprovadas pela literatura científica, nos amparando para isto em dados qualitativos da análise estatística não paramétrica, cujos resultados obtidos neste estudo serão apresentados a seguir em forma de argumentação.

Um total de 457 voluntários foi empregado para a efetivação do estudo na coleta de amostras fecais, as quais foram processadas por quatro diferentes técnicas parasitológicas, o que resultou na totalização de 1.828 exames. Vale ressaltar que mais de 95% das amostras foram coletadas e retornadas corretamente às unidades municipais envolvidas no estudo, o que, independentemente da condição econômico-social, vem a reforçar a concepção de que, sobremaneira quando bem informado, qualquer cidadão teria a capacidade de efetuar uma boa coleta de amostra fecal, independentemente do número de dias recomendado e quantidade (volume) da amostragem. Gomes *et al.* (2004) chegaram a mesma conclusão em um trabalho realizado com 1.244 indivíduos de baixo poder aquisitivo em quatro regiões distintas do Estado de São Paulo.

A elevada taxa de positividade encontrada, de 43,33% (198/457), refletiu diretamente a três fatores básicos, tais como: precárias condições de higiene da população; serviços sanitários deficientes; e moradias inadequadas. Dentre a positividade diagnóstica achada, catorze (14) espécies foram identificadas, sendo seis (6) espécies consideradas como pertencendo ao

agrupamento de protozoários, ao passo que, oito (8) espécies foram concebidas como pertencentes ao agrupamento de helmintíases intestinais. Talvez, esta dimensão tenha se estabelecido ao fato do ambiente ecológico proporcionado pelas regiões estudadas, que possibilitam a perfeita propagação de helmintos parasitos, especialmente levando em consideração as geohelmintíases. No entanto, apesar do número superior de espécies helmínticas, foram os protozoários que demonstraram maior intensidade de infecção, ao eliminarem 209 (67,86%) estruturas císticas, ante 99 (32,14%) dos helmintos.

O maior número de infecções causadas por protozoários atualmente, pode ser justificado pelo processo de industrialização que ocorreu no Brasil, após a década de 80, sobretudo nos grandes centros urbanos, fato que estimulou o êxodo rural, proporcionando a migração de grande parte da população rural para as periferias das áreas urbanas desses grandes centros (RIBEIRO, 1995). Esta migração ocorreu de forma irregular, expondo a maioria da população à falta de higiene, com reduzido serviço de saneamento básico e moradias inadequadas (IBGE, 2010), de maneira a ocasionar um novo perfil epidemiológico, denominado de “endemias urbanas”. Esta mudança de comportamento da população permitiu uma nova adaptação parasitária, através de um processo evolutivo, favorecendo a redução da intensidade média de infecção, com maior prevalência para as protozooses intestinais (GOMES *et al.*, 2004).

Segundo a tabela 1, visto de maneira qualitativa, a nova técnica de *TF-Test Modified* foi mais eficaz que o restante das técnicas parasitológicas, ao superar a segunda técnica mais sensível (*TF-Test Conventional*) com 25 (193 - 168) indivíduos infectados, e posteriormente com 170 (193 - 23) e 174 (193 - 19) de indivíduos infectados as técnicas de Kato-Katz/*Helm-Test* e Rugai, Mattos e Brisola, respectivamente. A nova técnica parasitológica (*TF-Test Modified*) apresentou maior número de tipo de infecção que as demais técnicas convencionais, para casos de monoparasitismo (simples) e poliparasitismo (dupla, tripla e múltipla, p.ex.), especialmente por demonstrar características de abrangência (ampla) diagnóstica. Igualmente, a nova técnica foi capaz de apresentar alta intensidade de infecção (total de infecção) para as enteroparasitoses, o que fez repercutir em cerca de 98,38% (303/308) do total de infecção exibido pela somatória de todas as técnicas parasitológicas (padrão ouro = 308). Estes números vêm exprimir o quanto uma região endêmica para parasitoses intestinais fica comprometido com o emprego de somente uma técnica parasitológica específica, como exemplo, da forma praticada nos programas governamentais. Isto vem reforçar a necessidade do emprego de técnicas mais abrangentes, não

somente em rotinas de laboratórios de análises clínicas, públicos e privados, mas também, em programas de esferas de âmbito municipal, estadual e federal.

No estudo, um total de 308 (67,41%) estruturas parasitárias foi detectado entre protozoários e helmintos intestinais (tabela 2). De forma qualitativa, a técnica modificada de *TF-Test* superou em eficácia as diferentes técnicas parasitológicas, mais precisamente ao mostrar 303 (66,30%) estruturas parasitárias, em oposição a 256 (56,02%) da técnica convencional de *TF-Test*, 23 (5,03%) da técnica de Kato-Katz/*Helm-Test*, e 19 (4,16%) da técnica de Rugai, Mattos e Brisola. As quatro técnicas parasitológicas foram capazes de identificar 209 (67,86%) estruturas císticas de protozoários, sendo que, a nova técnica parasitológica se sobressaiu em relação às demais técnicas na detecção de quatro espécies, ou seja, ao atingir um percentual de 56,82% - 175 estruturas císticas (tabela 2). Nesta situação, em duas circunstâncias (nas detecções de *B. hominis* e *E. histolytica* / *E. dispar*) a nova técnica se equiparou ao valor total do padrão ouro. Em outras duas condições, a técnica de *TF-Test Modified* se igualou a técnica de *TF-Test Conventional*, isto à concentração de estruturas císticas de *G. duodenalis* e *I. butschlii*.

A espécie de *B. hominis* foi a que apresentou maior positividade diagnóstica entre os protozoários intestinais, sendo detectada com maior eficiência pela nova técnica parasitológica (*TF-Test Modified*) em 84 casos (18,38%), de acordo com tabela 2. Convém mencionar que, é incomum o relato da presença desta espécie parasitária entre os resultados de exames de fezes praticados por laboratórios de análises clínicas, seja público ou privado, pela falta de prática dos profissionais de microscopia em identificar as variadas estruturas de resistência deste parasito, que faz repercutir em erro de interpretação, e também ao fato de um grande número de técnicas parasitológicas utilizarem água corrente em seus protocolos operacionais, que faz ocasionar a lise das estruturas deste protozoário, resultando em erro de procedimento. A figura 10 (A e B) demonstra a forma vacuolar deste parasito obtido pelas técnicas convencional e modificada de *TF-Test*. Estas técnicas foram capazes de evidenciar com exatidão as estruturas de resistência desta espécie parasitária, por utilizarem líquido preservador à base de solução neutra de formalina nas coletas e procedimento de concentração parasitária com eliminação de impurezas fecais em seus protocolos operacionais. Ademais, a eliminação de impureza fecal foi mais útil na técnica de *TF-Test Modified*, o que certamente favoreceu o maior encontro desta espécie de parasito, como evidenciado em tabela 2.

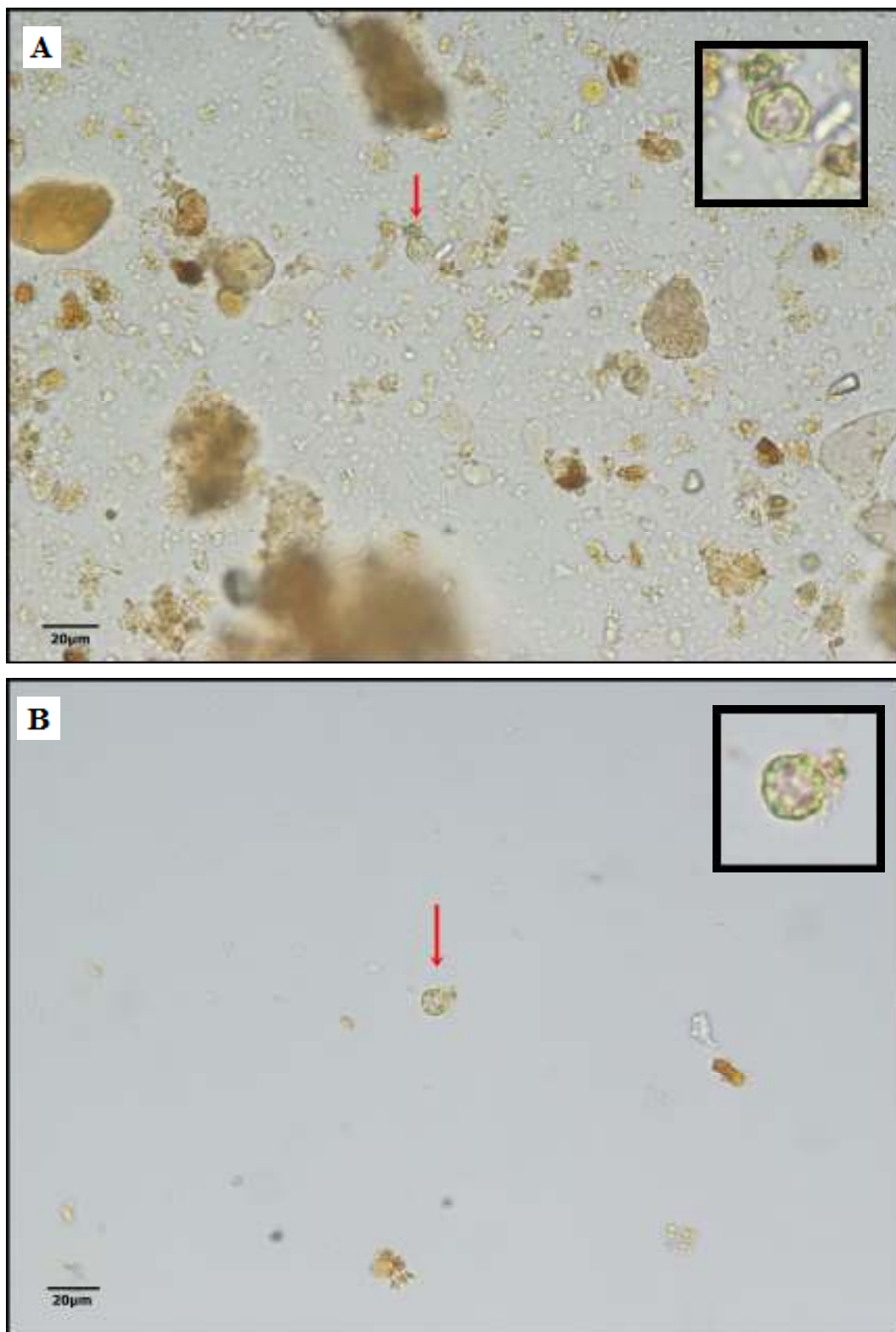


Figura 10: Estrutura vacuolar de *B. hominis*, conforme setas. Em (A), imagens adquiridas pela técnica de *TF-Test Conventional*; e em (B), imagens obtidas pela técnica de *TF-Test Modified*, mais exatamente a etapa de flutuação-espontânea.

Ainda entre as estruturas císticas de protozoários, em conformidade com a figura 11, foi possível observar que cistos de *G. duodenalis* foram melhores visualizados quando obtidos pela técnica de *TF-Test Modified*, do qual apresentou um campo de imagem livre do excesso de impurezas fecais, associado com alta concentração parasitária. Em análogo, a mesma característica de imagem foi observada nesta nova técnica para o encontro de outras espécies de protozoários, como exemplo: *E. coli*, *E. nana*, *I. butschlii*, e *E. histolytica/E. dispar*. A nitidez em que as estruturas de protozoários foram visualizadas no campo de imagem obtida pela técnica de *TF-Test Modified*, certamente foi atribuída à etapa de flutuação-espontânea com o emprego da solução saturada de sulfato de zinco, que foi responsável pela eliminação de grande parte das impurezas fecais e na demonstração seletiva de elevada concentração parasitária (tabela 1). Vale ainda ressaltar que o excesso de impurezas fecais em lâmina de microscopia pode favorecer resultados falsos negativos e/ou positivos, que, segundo relatos da literatura, podem estar muito presentes em rotinas de laboratórios de análises clínicas, público e privado.

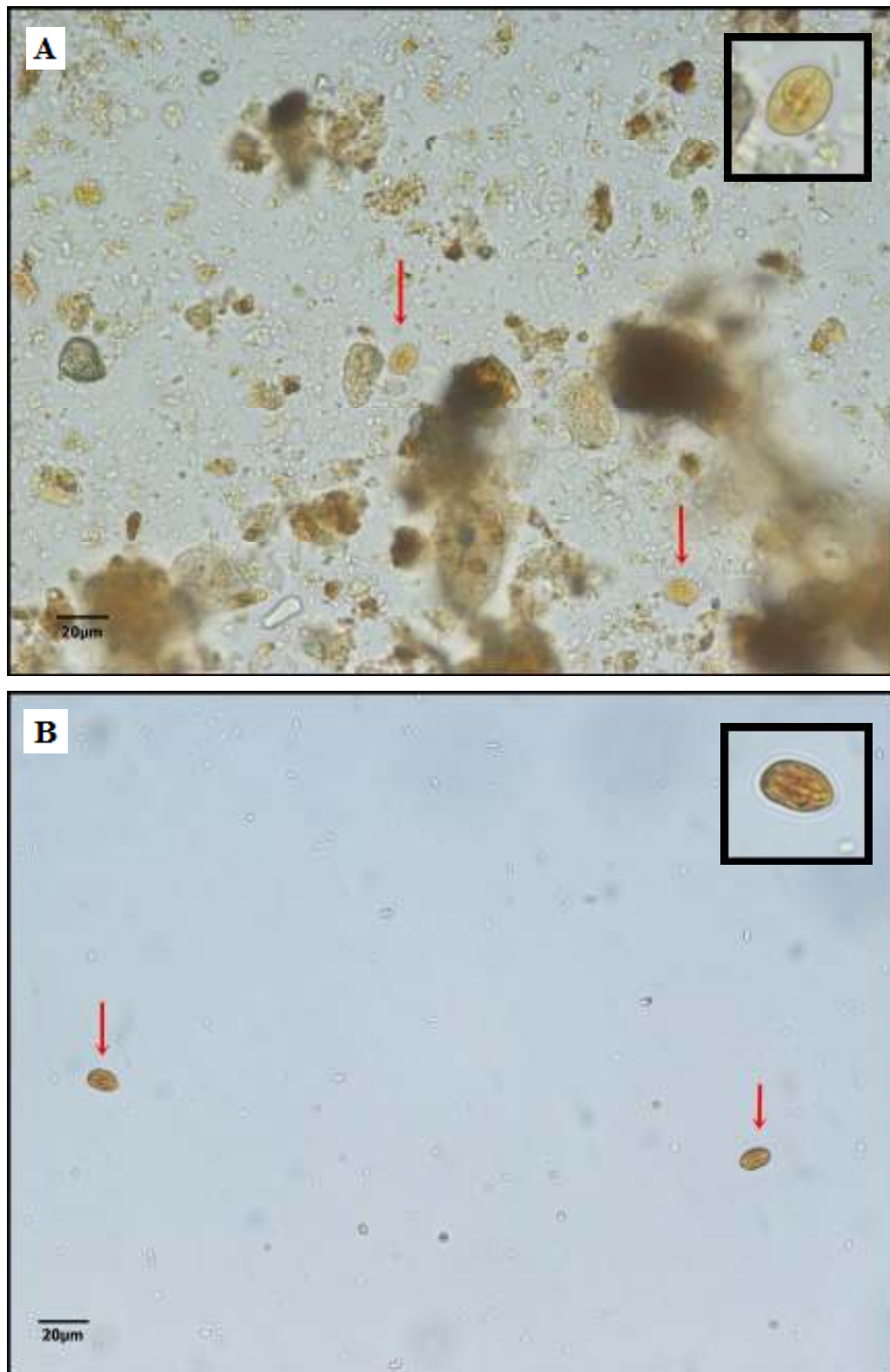


Figura 11: Cistos de *G. duodenalis* (de acordo com setas) com aumento microscópico de 400 vezes. Em (A), imagem conseguida por técnica de *TF-Test Conventional*; e em (B), imagem obtida por técnica de *TF-Test Modified*, na etapa de flutuação-espontânea.

No encontro de helmintos intestinais, como para protozoários, na obtenção de sete espécies parasitárias, a nova técnica modificada de *TF-Test* demonstrou de maneira qualitativa superioridade diagnóstica de 30,52% (94/308) em relação à segunda técnica mais eficaz (*TF-Test Conventional*), se igualando somente em um caso com a técnica convencional de *TF-Test*, mais exatamente na obtenção de ovos de *Taenia* spp (tabela 2). Na detecção superior das sete espécies de helmintos, a nova técnica parasitológica se comparou a somatória total de todas as técnicas (padrão ouro), mostrando a alta eficiência da etapa de sedimentação-espontânea com o uso de solução composto.

Na nossa experiência, observamos que muitos ovos de helmintos apresentaram densidades específicas inferiores a 1,17 g/mL, como exemplo, *A. lumbricoides* (fêtil), Ancilostomatídeos, *H. nana* e *E. vermicularis*. A literatura referencia que as densidades destes ovos podem variar de 1,10 g/mL a 1,15 g/mL. Com estas variações de densidades, estes ovos foram obtidos em alta concentração pela técnica de *TF-Test Modified*, sobretudo com o emprego da etapa de flutuação-espontânea com o uso de solução saturada de sulfato de zinco a 1,17 g/mL (Figs. 12 e 13), de maneira a superar as demais técnicas parasitológicas em eficácia diagnóstica (tabela 2).

Vale ressaltar, que apesar do encontro de ovos de *E. vermicularis* pela técnica, o método de escolha utilizado para o diagnóstico da enterobíase é o método elaborado por Graham (1941) consistindo no uso de um pedaço de fita gomada transparente com a face adesiva da fita voltada para região perianal.

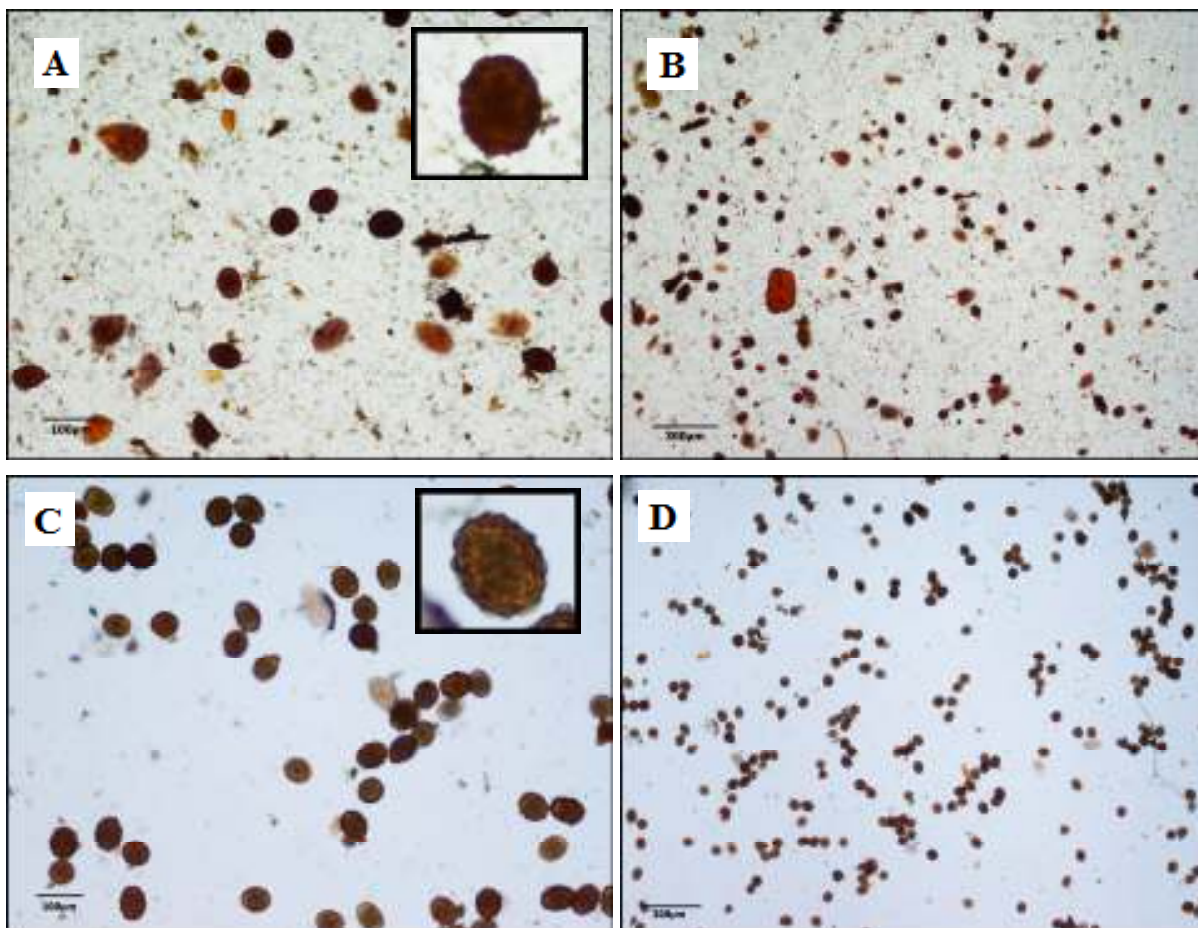


Figura 12: Identificação de ovos férteis de *A. lumbricoides* utilizando duas técnicas parasitológicas. Em (A), ovos detectados pela técnica de *TF-Test Conventional*, com aumento de 100 vezes em microscopia óptica. Em (B), mesma lâmina de microscopia, todavia, com aumento de 40 vezes. Em (C), ovos da mesma espécie parasitária localizados com o uso da técnica de *TF-Test Modified*, na etapa de flutuação-espontânea e com aumento microscópico de 100 vezes. Em (D), mesma lâmina, porém, com aumento de 40 vezes.

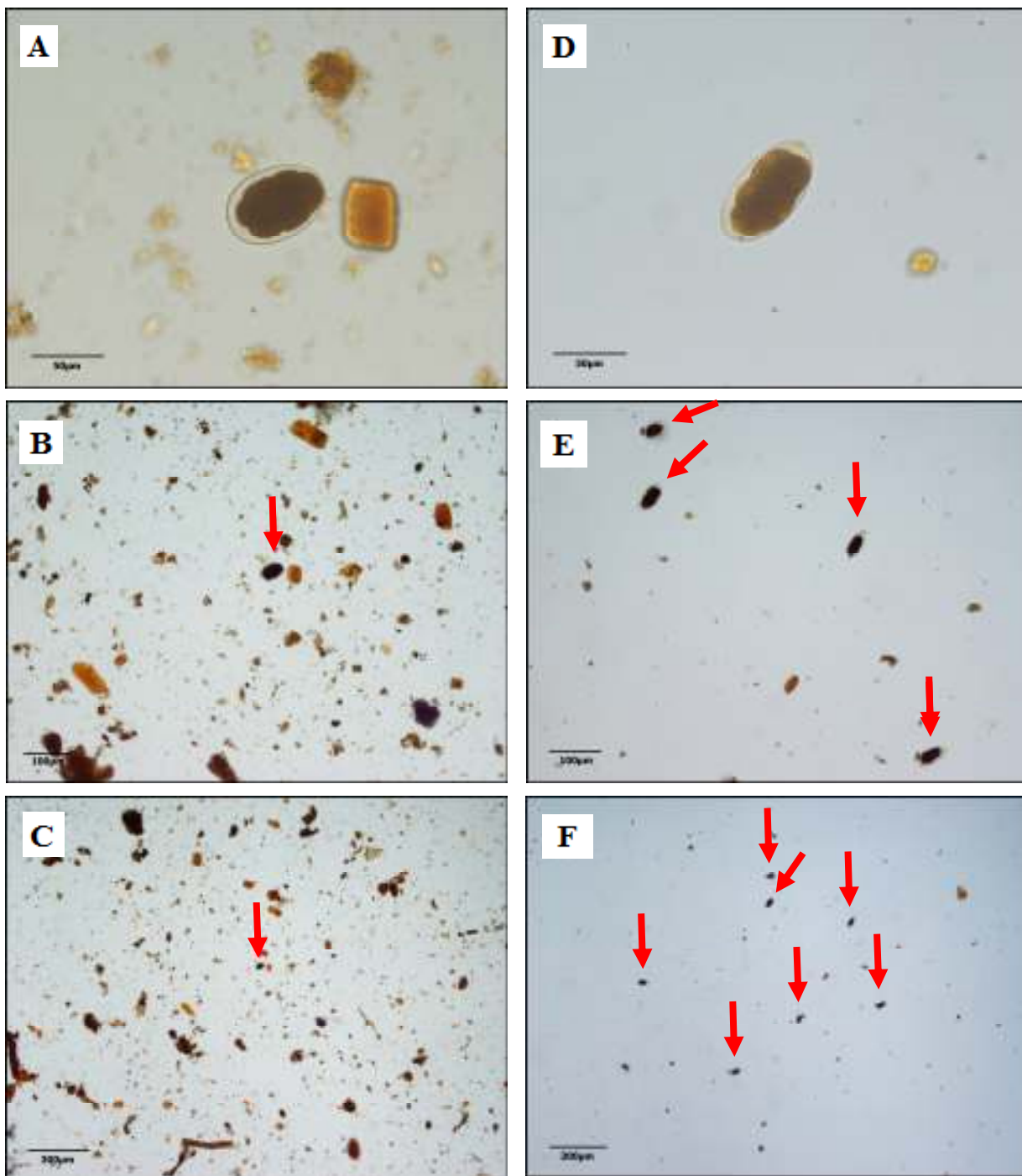


Figura 13: Ovos de ancilostomatídeos obtidos por duas técnicas parasitológicas. Em (A), ovo conseguido por meio da técnica de *TF-Test Conventional*, com aumento microscópico de 400 vezes. Em (B) e (C), mesma lâmina, todavia, com aumentos de 100 vezes e 40 vezes, respectivamente. Em (D), ovo da mesma espécie adquirido com o uso da técnica de *TF-Test Modified*, na etapa de flutuação-espontânea e com aumento microscópico de 400 vezes. Em (E) e (F), mesma lâmina, entretanto, com aumentos de 100 vezes e 40 vezes.

Em situação distinta, os nossos achados mostraram ainda que algumas espécies de helmintos exibiram densidades específicas superiores a 1,17 g/mL, como para os casos de ovos de *A. lumbricoides* (infértil), *T. trichiura*, *S. mansoni* e *Taenia* spp., e larvas de *S. stercoralis*. Nesta circunstância em que literatura estima que as densidades específicas destas espécies possam variar de 1,19 g/mL a 1,25 g/mL, a nova técnica parasitológica também demonstrou superioridade diagnóstica de forma qualitativa quando avaliada comparativamente com as demais técnicas convencionais (tabela 2), mais exatamente com o uso da etapa de sedimentação-espontânea e solução composto para eliminação de impurezas fecais.

Apesar de o exame coproparasitológico das fezes não ser recomendado como ferramenta de escolha para o encontro de ovos de *Taenia* spp., os nossos achados demonstraram em quatro situações as detecções destas estruturas pelas técnicas convencional e modificada de *TF-Test*, de maneira a se equipararem ao padrão ouro. Nestas condições, julgamos que estes ovos foram reconhecidos em maior concentração pela técnica de *TF-Test Modified*, mais exatamente na etapa de sedimentação-espontânea. Como exemplo, a figura 14B demonstra, em dois campos de imagens com ampliação de quatro vezes em lente objetiva, um ovo de *Taenia* spp. obtido pela técnica de *TF-Test Conventional*, ante três ovos (figura 15B) da mesma espécie parasitária conseguidos por *TF-Test Modified*. Esta condição sugeriu a maior concentração de ovos por campo para a técnica modificada de *TF-Test*.

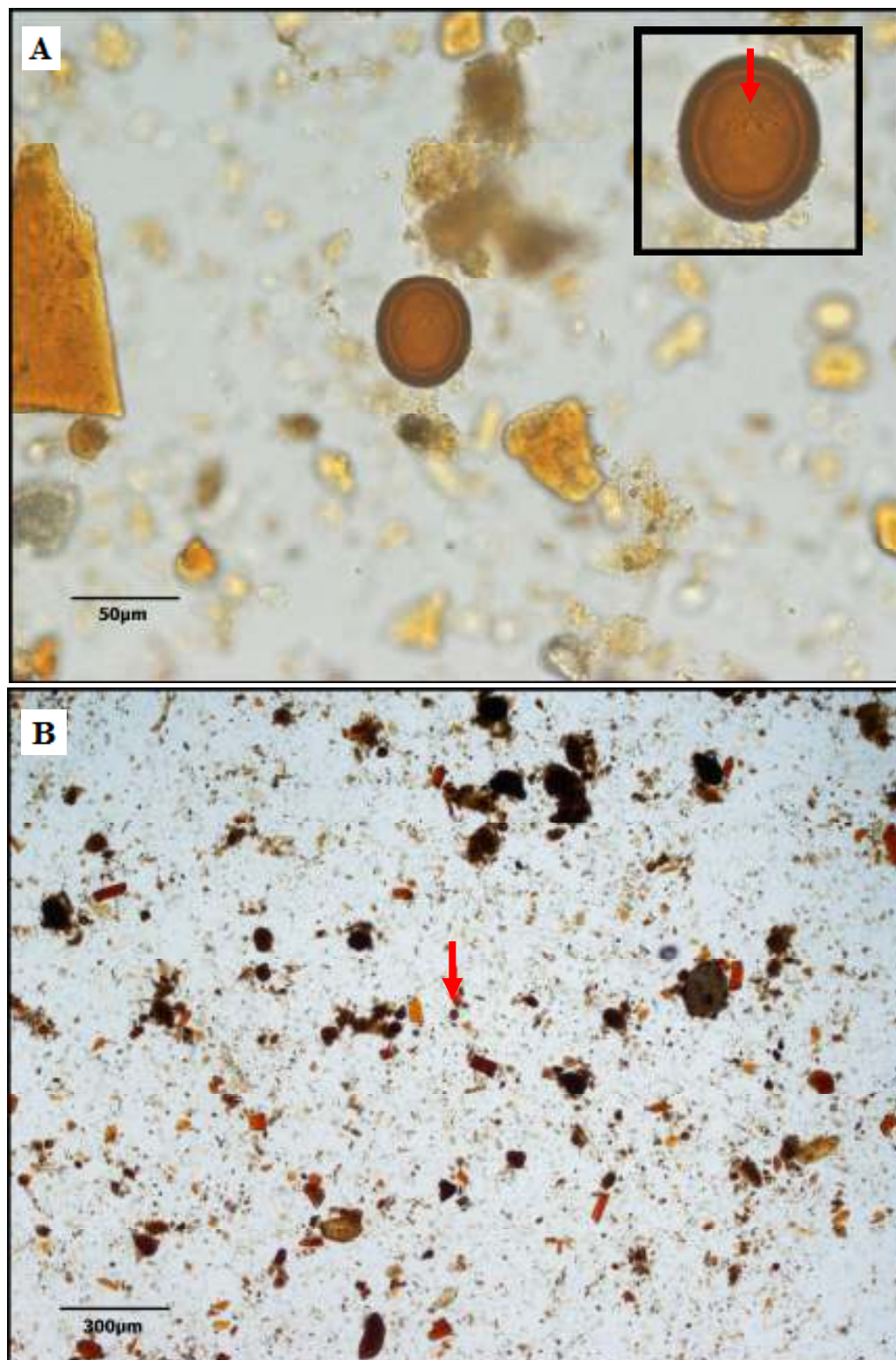


Figura 14: Detecção de ovos de *Taenia* spp. pela técnica de *TF-Test Conventional*. Em (A), ovo obtido com aumento microscópico de 400 vezes e seta indicando os acúleos. Em (B), mesma lâmina, porém, ovo com aumento de 40 vezes em microscopia.

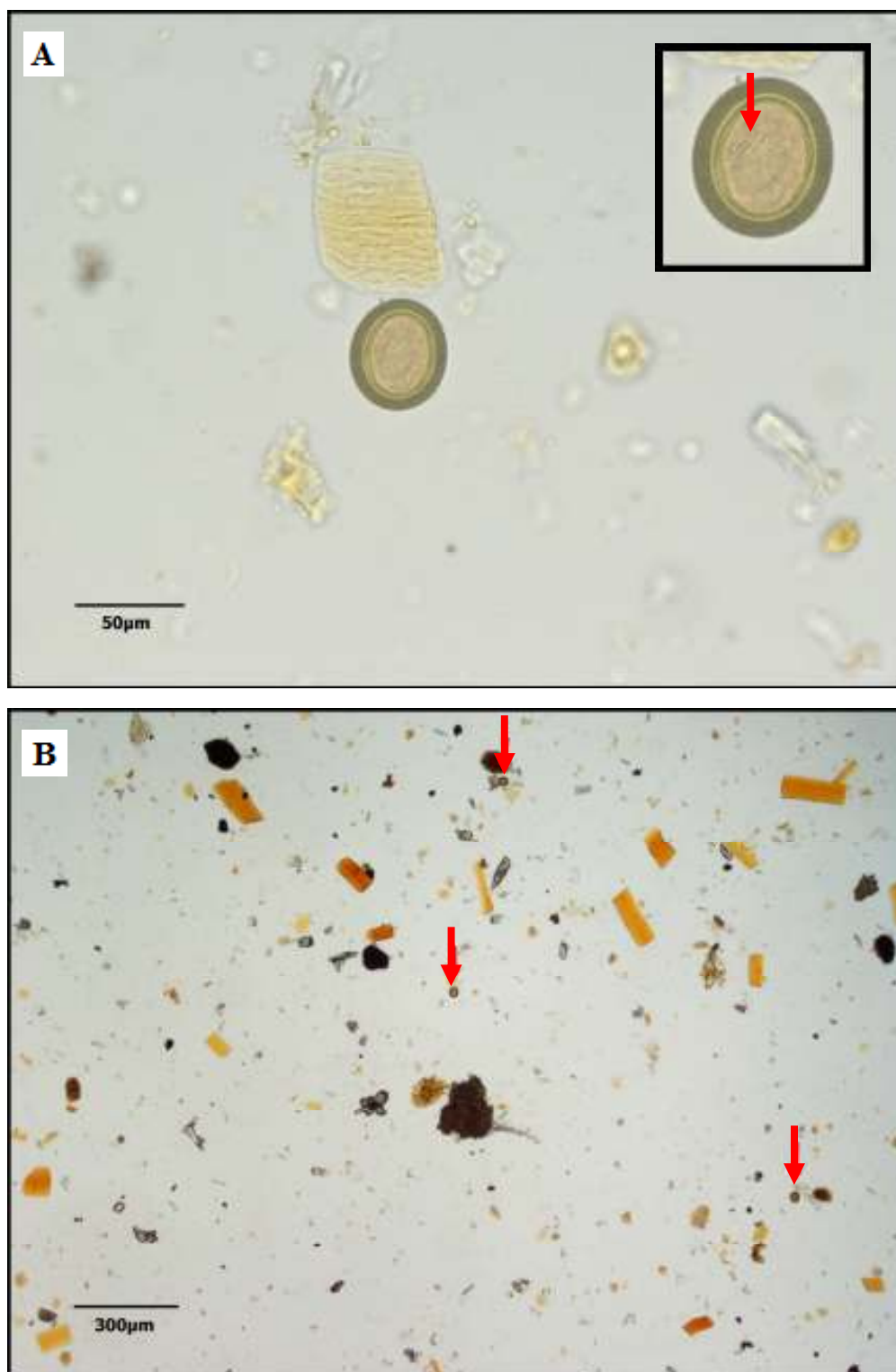


Figura 15: Detecção de ovos de *Taenia* spp. pela técnica de *TF-Test Modified*, na etapa de flutuação-espontânea e seta indicando os acúleos. Em (A), ovo obtido com aumento microscópico de 400 vezes. Em (B), mesma lâmina, porém, ovo com aumento de 40 vezes em microscopia.

Em uma avaliação ampla das técnicas convencional e modificada de *TF-Test*, vários parâmetros foram estimados, tais como: sensibilidade; eficiência; especificidade; valores preditivos positivos e negativos; e resultados falsos positivos e falsos negativos. A nova técnica de *TF-Test Modified* mostrou alta sensibilidade diagnóstica de 98,38% (303/308), contra 83,12% (256/308) da técnica de *TF-Test Conventional*. Em dez situações, a técnica de *TF-Test Modified* apresentou mais casos de infecções de voluntários quando comparada com a técnica convencional de *TF-Test*, repercutindo em um ganho diagnóstico de 15,26% (47 casos). Da mesma forma, a eficiência diagnóstica foi superior para a nova técnica modificada de *TF-Test*, com ganho de 10,28%. Estes resultados expressaram o quanto foram importantes às modificações proporcionadas à nova técnica de *TF-Test*. Devido ao fato de o padrão ouro, ou técnica de referência (tabela 2), ter sido obtido por meio da união de casos positivos entre as quatro técnicas parasitológicas, para as duas técnicas aqui avaliadas, a especificidade foi de 100%, pois, nenhuma espécie parasitária deixou de ser obtida por ambas as técnicas (149/149).

As duas técnicas parasitológicas de *TF-Test* apresentaram alto valor preditivo positivo de 100%. Porém, o valor preditivo negativo da técnica de *TF-Test Modified* foi mais seguro ao demonstrar 3,25% (5/154), em oposição a 25,87% (52/201) da técnica convencional de *TF-Test*. O valor falso positivo foi idêntico para as duas técnicas, ou seja, de 0% (1 - 1), pois, nesta condição, entendemos que os nossos achados microscópicos encontravam-se dentro da margem de segurança diagnóstica. Esta condição não prevaleceu ao falso resultado negativo, em que a nova técnica parasitológica (*TF-Test Modified*) se mostrou mais segura, ao ponto de ser mais eficaz em 15,26% (16,88% - 1,62%) do que a técnica convencional. Neste quesito, de acordo com tabela 6, a nova técnica demonstrou muita segurança, haja vista que, exibiu uma variação muito pequena e próxima de um grau de excelência (1 - 0,9838).

Na avaliação específica para o diagnóstico de larvas de *S. stercoralis*, três técnicas parasitológicas (*TF-Test Modified*, *TF-Test Conventional* e Rugai, Mattos e Brisola) foram medidas com os mesmos parâmetros estatísticos anteriormente mencionados, como exemplo: sensibilidade; eficiência; especificidade; valores preditivos positivos e negativos; e resultados falsos positivos e falsos negativos. Nesta situação, a técnica de *TF-Test Modified* exibiu alta sensibilidade diagnóstica de 96,15% (25/26), ficando atrás do padrão ouro em apenas uma situação (um voluntário). As outras técnicas mostraram sensibilidades de 84,15% (22/26) para *TF-Test Conventional* e 73,08% (19/26) à técnica específica de Rugai, Mattos e Brisola. No

entanto, as eficiências diagnósticas das três técnicas parasitológicas estiveram muito próximas ao apresentarem 99,78% para *TF-Test Modified*, 99,12% para *TF-Test Conventional* e 98,46% para Rugai, Mattos e Brisola. A especificidade foi de 100% para as três técnicas em estudo, uma vez que, as larvas de *S. stercoralis* foram obtidas por todas as técnicas parasitológicas. O valor preditivo positivo mostrou-se alto e análogo para as três técnicas (100%), porém, o valor negativo apresentou-se diferente para estas técnicas, especialmente ao indicar 0,23% (1/432) para a técnica de *TF-Test Modified*, 0,92% (4/435) para *TF-Test Conventional*, e 1,60% (7/438) para Rugai, Mattos e Brisola. Os resultados falsos positivos tiveram valores semelhantes para as três técnicas (100%), enquanto que os resultados falsos negativos foram mais consistentes para a técnica de *TF-Test Modified*, que mostrou baixa variação negativa de 3,85% (1 - 0,9615), ante os valores negativos de 15,85% (1 - 0,8415) e 26,92% (1 - 0,7308) das técnicas de *TF-Test Conventional* e Rugai, Mattos e Brisola. Estes números vêm a exprimir a necessidade do uso de técnica com características de múltiplas coletas de material fecal e concentração parasitária para a detecção das larvas de *S. stercoralis*, no qual apresentam ciclo biológico irregular para as suas eliminações em fezes, de modo a assemelhar-se com a eliminação desarmônica mostrada por protozoários intestinais.

A figura 16 demonstra larvas de *S. stercoralis* conseguidas por processamentos laboratoriais de três técnicas parasitológicas com amostra fecal de mesmo voluntário. É possível observar que a técnica de Rugai, Mattos e Brisola (figura 16, A e B) apresentou campo de imagem em microscopia com poucas impurezas fecais e boa concentração parasitária (10 larvas por campo - Fig. 16, B). Neste procedimento técnico, devido ao fato de não haver nenhuma força gravitacional (centrifugação) exercida sobre a obtenção das larvas de *S. stercoralis*, foram conseguidas pelo procedimento de sedimentação-espontânea por hidrotropismo positivo, o campo da lâmina de microscopia apresentou-se quase que sempre livre de impurezas fecais. Da mesma forma, a figura 16 (C e D), a qual foi aproveitada por meio do processamento laboratorial da técnica de *TF-Test Conventional*, exibiu campo de imagem (Fig.16, D) com boa concentração parasitária (9 larvas por campo), porém, diferentemente da técnica anterior, com maior quantidade de resíduos fecais. Pelo fato de a técnica convencional de *TF-Test* utilizar-se de princípio laboratorial de centrífugo-sedimentação para a concentração de larvas de *S. stercoralis*, isto fez acarretar em maior quantidade de impurezas no sedimento fecal, apesar da utilização de soluções reagentes de eliminação de gorduras e detritos em seu protocolo operacional.

Por outro lado, a lâmina obtida pela técnica de *TF-Test Modified* (figura 16, E e F) mostrou campo com elevada concentração (com mais de 40 larvas - Fig. 16, F) de larvas de *S. stercoralis*, e moderada presença de impurezas fecais (Fig. 15, F). Apesar de esta técnica também empregar o princípio de centrífugo-sedimentação para alcançar larvas deste nematoide intestinal, *S. stercoralis*, o emprego da etapa de modificação, com o uso de solução composta e densidade e viscosidade ideal do meio, fez que estas larvas sedimentassem em grande número e com a eliminação de grande parte das impurezas fecais (figura 16, E e F), de maneira a resultar em eficácia diagnóstica.

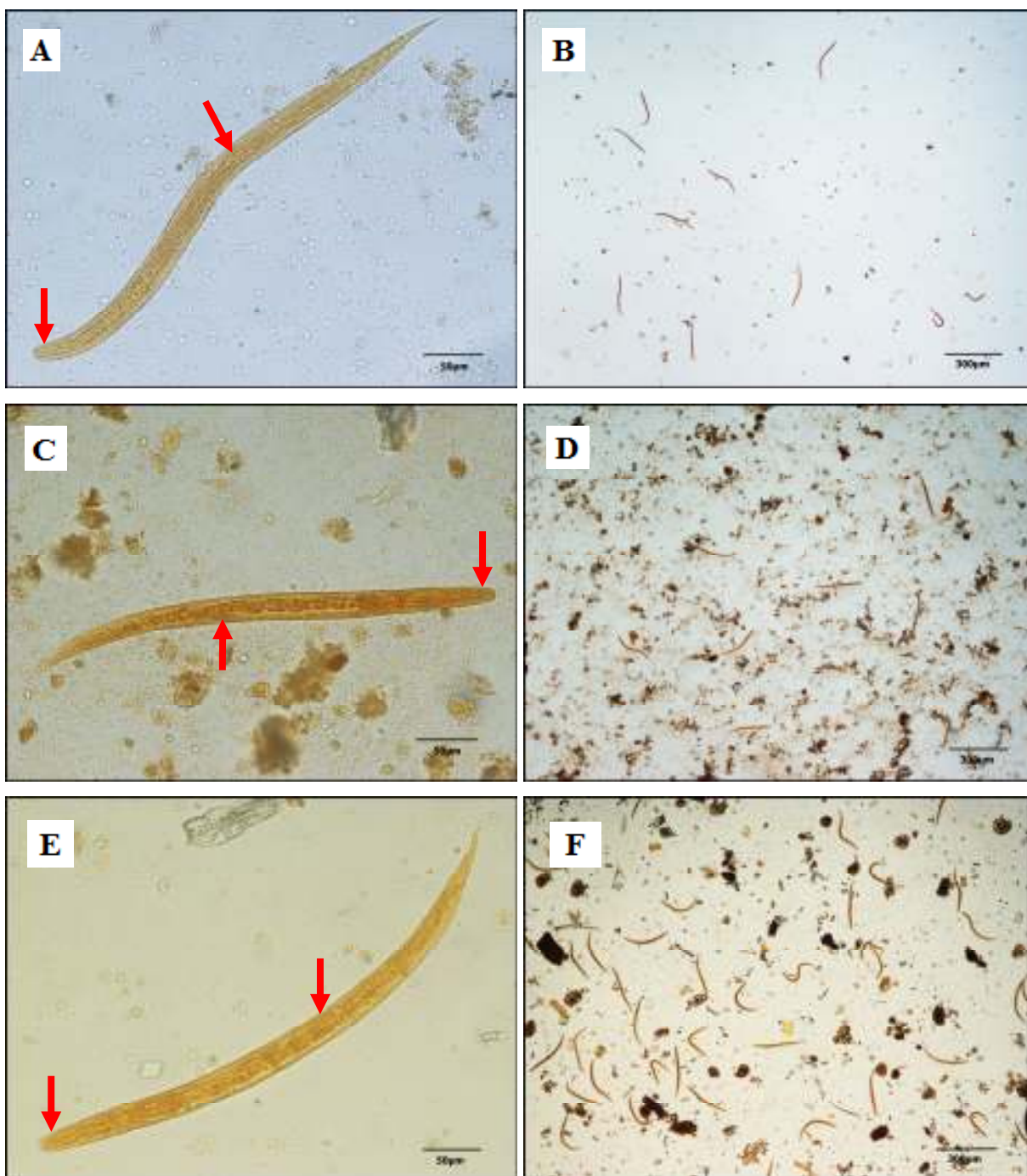


Figura 16: Larvas rabditoides de *S. stercoralis* identificadas por diferentes técnicas parasitológicas com setas indicando vestíbulo bucal curto e primórdio genital evidente. Em (A), larva detectada pela técnica de Rugai, Mattos e Brisola, com aumento microscópico de 400 vezes e em (B) mesma lâmina, porém, com aumento de 40 vezes. Em (C), larva detectada na técnica de *TF-Test Conventional*, com aumento de 400 vezes e em (D) com aumento de 40 vezes. Em (E), larva identificada na técnica de *TF-Test Modified*, na etapa de sedimentação-espontânea com aumento microscópico de 400 vezes e (F) com aumento de 40 vezes.

Ainda de maneira específica, uma avaliação de desempenho diagnóstico foi aplicada para o reconhecimento de outra espécie parasitária: *S. mansoni*. Nesta situação, três técnicas foram usadas de forma qualitativa, tais como: *TF-Test Modified*, *TF-Test Conventional* e Kato-Katz/*Helm-Test*. Para esta avaliação, como das vezes anteriores, foram feitos usos de vários parâmetros estatísticos, tais como: sensibilidade; eficiência; especificidade; valores preditivos positivos e negativos; e resultados falsos positivos e falsos negativos. Segundo a tabela 5, a nova técnica parasitológica de *TF-Test Modified* se equiparou ao padrão ouro, ou seja, com a somatória de todas as técnicas parasitológicas (100% - 14/14), sendo superior em 28,57% (4/14) quando comparada com a segunda técnica mais eficaz (*TF-Test Conventional*), e melhor em 35,71% (5/14) que a técnica de Kato-Katz/*Helm-Test*. As eficiências diagnósticas destas técnicas estiveram muito próximas, ao liberarem resultados de 100% (457/457) para *TF-Test Modified*, 99,12% (453/457) para *TF-Test Conventional*, e 98,90% (452/457) para Kato-Katz/*Helm-Test*. Como para as avaliações anteriores, a especificidade foi de 100% (443/443) para todas as técnicas parasitológicas, e o valor preditivo positivo mostrou-se em igualdade para as três técnicas (100%). Por sua vez, o valor negativo apresentou ser diferente, especialmente ao indicar 0% (0/443) para a técnica de *TF-Test Modified*, 0,89% (4/447) para *TF-Test Conventional*, e 1,12% (5/448) para Kato-Katz/*Helm-Test* (tabela 8). Os resultados falsos positivos tiveram valores idênticos para as três técnicas (100%), ao passo que o falso resultado negativo foi estável para a técnica de *TF-Test Modified*, que não mostrou variação negativa, 0% (1 - 1), em restrição a valores negativos de 28,58% (1 - 0,7142) e 35,72% (1 - 0,6428) das técnicas de *TF-Test Conventional* e Kato-Katz/*Helm-Test*, respectivamente.

Os resultados acima apresentados mostraram que a técnica específica de Kato-Katz/*Helm-Test*, apesar de ser amplamente utilizada em trabalhos de campo, pode deixar a desejar em eficiência diagnóstica, sobretudo, quando a eliminação de ovos pela fêmea do parasito *S. mansoni* for muito baixa, condição esta encontrada frequentemente em regiões de baixa endemicidade para esquistossomíase mansônica. Vem a reforçar o nosso comentário o estudo realizado Bergquist e colaboradores, no ano de 2009, em que estes autores concluíram que a técnica de Kato-Katz teve a capacidade de concentrar cerca de 50% dos ovos em regiões endêmicas com característica de baixa endemicidade para esta parasitose. Kongs e colaboradores, no ano de 2001, chegaram com conclusão semelhante no estudo realizado com 1.255 indivíduos em uma região endêmica para *S. mansoni*. Nesta mesma circunstância, Luís Rey (2008)

referencia perdas de até 2/3 dos casos existentes nos exames das fezes realizados pela técnica Kato-Katz, devido, sobretudo, ao fato desta técnica ser capaz de processar apenas 50mg de fezes em laboratório. Convém ressaltar que, em conformidade com protocolo operacional, individualmente, as técnicas convencional e modificada de *TF-Test* são capazes de processarem cerca de 5 g de fezes de uma só vez, ou seja, quase 100 vezes mais material fecal que a técnica de Kato-Katz/*Helm-Test*. Ademais, os nossos achados permitiram identificar que a depender da consistência da amostra fecal coletada, como por exemplo, semi-pastosa e/ou líquida, com coloração muito escura e demasiadamente ressequida, pode se tornar um impeditivo para a detecção de ovos de *S. mansoni* pela técnica de Kato-Katz/*Helm-Test*.

Visto ainda de forma ampla, as quatro técnicas parasitológicas foram avaliadas se amparando na análise estatística não paramétrica e utilizando o índice *Kappa* (*k*), que indicou *Rank*, Desvio Padrão (DP) e o Índice de Concordância (IC) existente entre dados qualitativos, positivos e negativos, que variaram de 0 a 1,0. De acordo com tabela 9, a técnica de *TF-Test Modified* apresentou elevado índice *Kappa* (0,975), demonstrou grau de concordância *Quase Perfeito*, alto índice de concordância (IC), que oscilou de 0,954 a 0,997 quando estimado a 95% ($P < 0,05$), e o valor do desvio padrão (DP) de 0,011. Esta técnica apresentou ainda elevado número de acordos de 452 (98,91% das observações), número de acordos esperados ao acaso de 254,4 (55,67% das observações), sendo nesta condição a força de acordo considerada muito boa. Estes números vêm expressar o eminente valor *Kappa* apresentado por esta nova técnica parasitológica, a qual demonstrou importante grau de concordância, que esteve sempre acima de 0,997, e baixíssimo desvio padrão, o que vem a reforçar a sua estabilidade estatística com qualidade de eficácia diagnóstica para a aplicabilidade em rotina de laboratórios de análises clínicas.

Entretanto, visto de maneira específica, foram aplicados os mesmos métodos de análise estatística não paramétrica com o uso de índice *Kappa*, porém, nesta condição, para avaliação de ovos de *S. mansoni* e larvas de *S. stercoralis*. Na primeira situação, de acordo com tabela 10, três técnicas foram analisadas de forma qualitativa, como exemplo: *TF-Test Modified*; *TF-Test Conventional*; e Kato-Katz/*Helm-Test*. A técnica modificada de *TF-Test* apresentou excelente índice *Kappa* (1,000), exibiu grau de concordância *Quase Perfeito*, foi precisa no índice de concordância (IC), que variou de 1,000 a 1,000 quando estimado a 95% ($P < 0,05$), e mostrou valor do desvio padrão (DP) de 0. Ainda para esta nova técnica, o número de acordos observados

foi de 457 (100,00% das observações), o número de acordos esperados ao acaso foi de 429,9 (94,06% das observações), sendo a força de acordo considerada como perfeita. A estabilidade estatística desta técnica foi perfeita quando vista de maneira específica para a detecção de ovos de *S. mansoni*, uma vez que, ela se equiparou ao valor padrão (14/14) no estudo de 457 indivíduos do município de Campinas, SP. Ademais, esta técnica proporcionou um campo de imagem livre em grande parte de detritos fecais, o que tornou favorável a localização dos ovos de *S. mansoni* (figura 17).

Por sua vez, quando analisada pelos mesmos critérios, a técnica convencional de *TF-Test* exibiu bom índice *Kappa* (0,829), grau de concordância *Quase Perfeito*, índice de concordância (IC) que variou de 0,665 a 0,993, em estimativa de 95% ($P < 0,05$), valor do desvio padrão (DP) de 0,084, número de acordos observados de 453 (99,12% das observações), o número de acordos esperados ao acaso de 433,6 (94,88%), e a força de acordo considerada como muito boa. Todavia, o seu índice de concordância alternou valores abaixo de 0,81 (0,665 a 0,810), o que, nesta ocasião, poderia classificar esta técnica com grau de concordância *Substancial*, que, segundo Feinstein (1985), pode oscilar de 0,61 a 0,80.

Com a aplicação dos mesmos critérios estatísticos qualitativos, a técnica de Kato-Katz/*Helm-Test* alcançou moderado índice *Kappa* (0,777), grau de concordância *Substancial*, índice de concordância que oscilou de 0,588 a 0,967 quando estimado a 95% ($P < 0,05$), valor do desvio padrão (DP) de 0,097, número de acordos observados de 452 (98,91%), número de acordos esperados ao acaso de 434,6 (95,09%), e força de acordo considerada como boa. Da mesma forma anterior, o índice de concordância desta técnica alternou valores abaixo de 0,60 (0,588 a 0,600), o que, nesta situação, poderia classificá-la com grau de concordância *Moderado*, que, de acordo com Feinstein (1985), pode oscilar de 0,41 a 0,60.

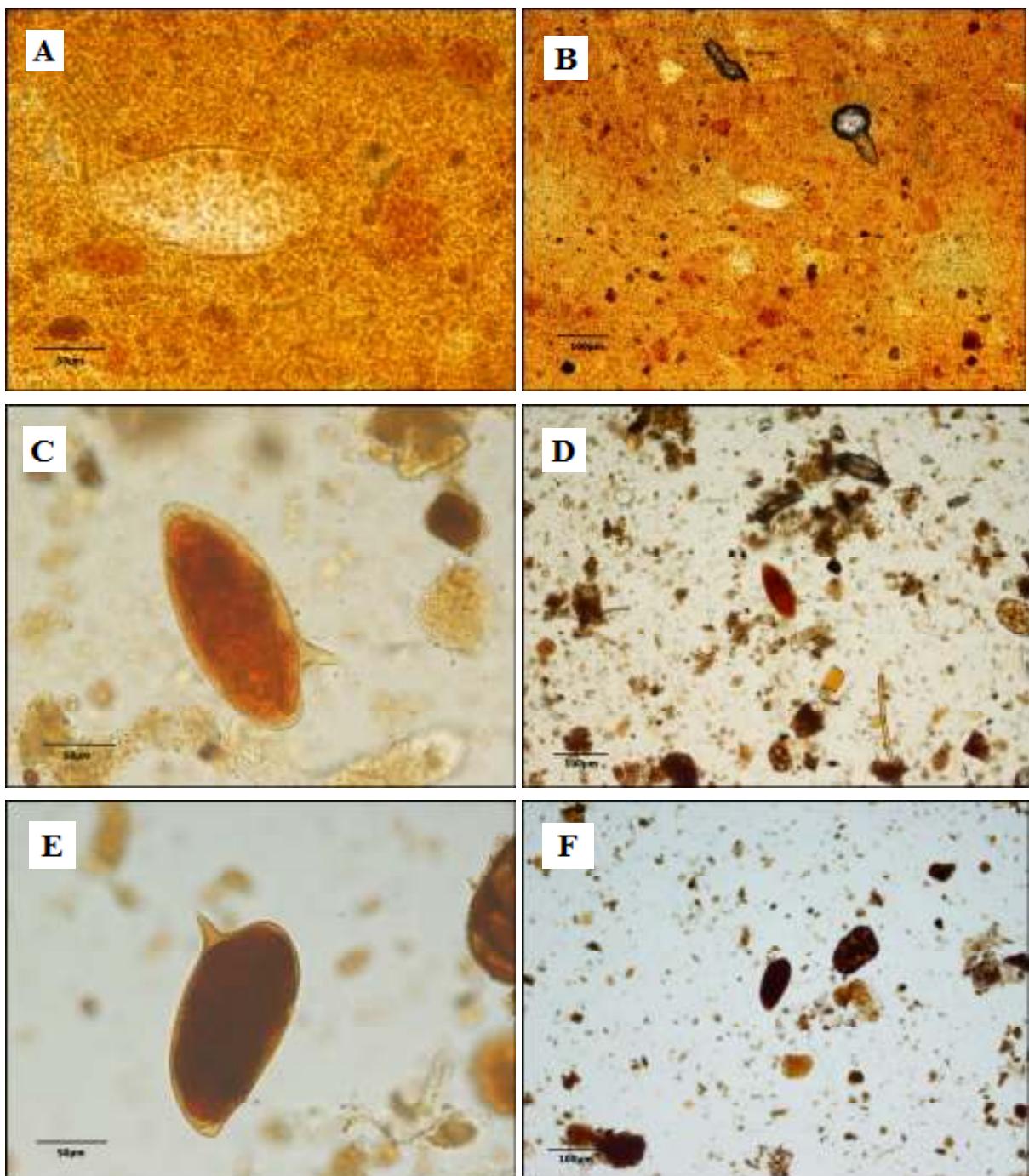


Figura 17: Ovos de *S. mansoni* obtidos pelo emprego de três técnicas parasitológicas. Em (A), ovo adquirido pela técnica de Kato-Katz/*Helm-Test*, com aumento de 400 vezes em microscopia. Em (B), mesma lâmina, no entanto, com aumento de 100 vezes. Em (C), ovo conseguido por intermédio da técnica de *TF-Test Conventional*, com aumento microscópico de 400 vezes. Em (D), mesma lâmina, porém, com aumento de 100 vezes. Em (E), ovo obtido pela técnica de *TF-Test Modified*, mais exatamente na etapa de sedimentação-espontânea e com aumento de 400 vezes em microscopia. Em (F), mesma lâmina com aumento de 100 vezes.

Para análises de ovos de *S. mansoni*, foram usados os mesmos métodos de análise estatística não paramétrica com o uso de índice *Kappa*, contudo, para a avaliação qualitativa de larvas de *S. stercoralis*. Em conformidade com tabela 11, três técnicas foram empregadas, a saber: *TF-Test Modified*; *TF-Test Conventional*; e Rugai, Mattos e Brisola. A técnica parasitológica de *TF-Test Modified* apresentou elevado índice *Kappa* (0,979), demonstrou um grau de concordância *Quase Perfeito*, alto índice de concordância (IC), que oscilou de 0,939 a 1,000 quando estimado a 95% ($P < 0,05$), bom valor do desvio padrão (DP) de 0,021, número de acordos observados de 456 (99,78% das observações), número de acordos esperados ao acaso de 408,8 (89,46% das observações), e força de acordo considerada como muito boa.

Em condição oposta, a técnica convencional de *TF-Test* exibiu alto índice *Kappa* (0,912), grau de concordância *Quase Perfeito*, elevado índice de concordância (IC), que variou de 0,827 a 0,998, em estimativa de 95% ($P < 0,05$), valor do desvio padrão de 0,044, número de acordos observados de 453 (99,12%), número de acordos esperados ao acaso de 411,5 (90,04%), e a força de acordo considerada como muito boa.

Por sua vez, na mesma circunstância, a técnica convencional e específica de Rugai, Mattos e Brisola alcançou bom índice *Kappa* (0,837), grau de concordância *Quase Perfeito*, índice de concordância (IC) que oscilou de 0,718 a 0,955 quando estimada a 95% ($P < 0,05$), valor do desvio padrão de 0,060, número de acordos igual a 450 (98,47%), número de acordos esperados ao acaso de 414,2 (90,63%), e força de acordo considerada como muito boa. O índice de concordância desta técnica alternou valores abaixo de 0,80 (0,718 a 0,800), condição esta que poderia classificá-la com grau de concordância *Substancial*, que, de acordo com Feinstein (1985), pode oscilar de 0,41 a 0,60.

Por último, de modo geral, a nova técnica parasitológica de *TF-Test Modified* permitiu encontrar com alta eficiência diagnóstica todas as estruturas parasitárias estudadas. Esta técnica mostrou um notável diagnóstico verdadeiro, especialmente quando analisada comparativamente com outras técnicas consagradas pela literatura, por meio de estatística não paramétrica, o que a deixa apta para sua aplicação em rotinas de laboratórios de análises clínicas, seja público ou privado.

6. CONCLUSÃO

O estudo efetivado para o desenvolvimento, avaliação e validação de nova técnica parasitológica permitiu concluir que:

- A técnica de *TF-Test Modified* apresentou lâminas de microscopia com alta concentração parasitária e com poucas quantidades de resíduos fecais.
- As modificações acrescentadas na técnica de *TF-Test* proporcionaram alta eficácia diagnóstica, de maneira a elevar a sensibilidade em 15,26% quando comparada com a técnica de *TF-Test Conventional*.
- A nova técnica parasitológica sobressaiu-se em relação a técnica de Rugai, Mattos e Brisola na detecção específica de larvas de *S. stercoralis*.
- O *TF-Test Modified* foi superior no encontro de ovos de *S. mansoni* quando comparada qualitativamente com a técnica de Kato-Katz/*Helm-Test*.
- O *TF-Test Modified* pode ser utilizado de forma abrangente no diagnóstico qualitativo de protozoários e helmintos intestinais de humanos. O ganho de sensibilidade proporcionada por esta nova técnica deverá ser de estimável contribuição para o diagnóstico individual laboratorial, inquéritos populacionais e controle das parasitoses intestinais, de modo a repercutir em contribuição social.

7. Anexos

Anexo A: Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

 www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 17/08/11
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 570/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0501.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO DE UMA NOVA TÉCNICA (TF-TEST MODIFIED) DESTINADA AO DIAGNÓSTICO DE PARASITOSEs INTES TINAI S EM AMOSTRAS FECALIS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Juliana Barboza de Carvalho

INSTITUIÇÃO: Secretaria Municipal de Educação – Prefeitura Municipal de Campinas

APRESENTAÇÃO AO CEP: 13/06/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 17/08/12 (O formulário encontra-se no site acima).

II – OBJETIVOS.

Avaliar a técnica parasitológica TF-Test Modified em relação às técnicas TF-Test Conventional, Rugai, Mattos & Brisola e Kato-Katz.

III – SUMÁRIO.

O trabalho será realizado com 300 voluntários menores de idade (10anos) por ser um grupo mais vulnerável às enteroparasitoses (sistema imunológico imaturo, hábitos de higiene e possível destruição). Os pais, devidamente instruídos pelas direções escolares, participarão de reuniões esclarecedoras com as pesquisadoras envolvidas (objetivos, orientações sobre a coleta de fezes em casa, ... Caso a criança apresente algum a presença de parasitos intestinal, a mesma será encaminhada ao Centro de Saúde de Referência. Para a criança não há desconforto nenhum.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.



O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO.

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de junho de 2011.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo B: Manual de Instruções

INSTRUÇÕES PARA COLETA

Para realizar a coleta você está recebendo:



1º Escreva o **nome da criança** na **etiqueta** do **frasco de boca larga** e na **embalagem do kit *TF-test***.

2º Defecar sobre papel limpo e seco.

3º Colete 3 amostras em dias alternados (dia sim, dia não).



Após a coleta, guarde somente este frasco na geladeira.



Entrega das amostras: _____

Coleta *TF-Test*



1 - Abra o tubo cuidadosamente, simulando o movimento de rosca, para não derramar o líquido.



2 - Utilizando a pá coletora, colete a amostra de fezes, como demonstrado na ilustração.



3 - Ao depositar a amostra no tubo coletor, não ultrapasse a faixa de tolerância.



4 - Feche bem o tubo coletor, pressionando a tampa até ouvir o som de encaixe (click).



5 - Agite bem o tubo coletor até a diluição do material fecal coletado.



6 - Efetue esse processo de coleta em dias alternados (dia sim, dia não) nos três tubos coletores.

Após a coleta, lave bem as mãos!



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, A; AL-MEKHLAFI, H. M; SURIN, J. **Epidemiology of soil-transmitted helminthiases in Malaysia.** Southeast Asian J Trop Med Public Health. 42(3): 527-38. 2011.
- AJJAMPUR, S. S; KOSHY, B; VENKATARAMANI, M; SARKAR, R; JOSEPH, A. A; JACOB, K. S; WARD, H; KANG, G. **Effect of cryptosporidial and giardial diarrhoea on social maturity, intelligence and physical growth in children in a semi-urban slum in south India.** Ann Trop Paediatr. 31(3): 205-12. 2011.
- AL, F. D. & HÖKELEK, M. **Is *Blastocystis hominis* an opportunist agent?** Turkiye Parazitolo Derg. 31(1): 28-36. 2007.
- ANDRADE, Z, A. **Schistosomiasis and liver fibrosis.** Parasite Immunol.31(11): 656-63. 2009.
- ARORA, D. R & ARORA, B. **AIDS-associated parasitic diarrhoea.** Indian J Med Microbiol. 27(3): 185-90. 2009.
- BAERMANN, G. **Eine Einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomun (Nematoden) Larven in Erdpnoen.** Mededeel. mit h. Geneesk. Lab. Weltreve Feestbundel Batavia, p. 41-47, 1917.
- BAIOMY, A. M; MOHAMED, K. A; GHANNAM, M. A; SHAHAT, S. A; AL-SAADWY, A. S. **Opportunistic parasitic infections among immunocompromised Egyptian patients.** J Egypt Soc Parasitol.40(3):797-808. 2010.
- BALDURSSON, S; KARANIS, P. **Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010.** Water Res. 15;45(20):6603-14. 2011.
- BARRETO, M. L; GENSER, B; STRINA, A; TEIXEIRA, M. G; ASSIS, A. M; REGO, R. F.; TELES, C. A; PRADO, M.S; MATOS, S; ALCÂNTARA-NEVES, N. M; CAIRNCROSS, S. **Impact of a citywide sanitation program in Northeast Brazil on intestinal parasites infection in young children.** Environ Health Perspect. 118(11): 1637-42. 2010.
- BIOBRASIL TECNOLOGIA. **TF-Test: Procedimento de Coleta.** Disponível em: <<http://www.bio-brasil.com/tftest/procedimentos.html>>. Acesso em junho de 2013.
- BORGES, W.F; MARCIANO, F.M; OLIVEIRA, H.B. **Parasitoses intestinais: elevada prevalência de *Giardia lamblia* em pacientes atendidos pelo serviço público de saúde da região sudeste de Goiás, Brasil.** 40(2):149-157. 2011.
- BRANDELLI, C.L; CARGNIN, S.T; WILLERS, D.M; OLIVEIRA, K.R; TASCA, T. **Comparison between spontaneous sedimentation method and Paratest® for the diagnosis of intestinal parasitic infections.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 105(10):604-6. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Plano nacional de controle das enteroparasitoses**. Brasília/DF. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: guia de bolso**. 8ª ed. Brasília/DF. 2010.

CAMPOS, R; BRIQUES, W; **Levantamento multicêntrico de parasitoses intestinais**; Simpósio “Giardíase e Amebíase” – “ International Congress For Infectious Diseases; In: V Congresso da Sociedade Brasileira de Infectologia, R.J.; 17-27. 1988.

CARVALHO, G. L; MOREIRA, L. E; PENA, J. L; MARINHO, C. C; BAHIA, M. T; MACHADO-COELHO, G. L. **A comparative study of the TF-Test®, Kato-Katz, Hoffman-Pons-Janer, Willis and Baermann-Moraes coprologic methods for the detection of human parasitosis**. Mem Inst Oswaldo Cruz. 107(1):80-4.2012.

CHAVES, E.M.S; VAZQUEZ, L; LOPES, K; FLORES, J; OLIVEIRA, L; RIZZI, L; FARES, E.Y; QUERO, M. **Levantamento de Protozoonoses e Verminoses nas creches municipais de Uruguaiana, Rio Grande do Sul – Brasil**. RBAC. 38(1):39-41. 2006.

CHERO, J. C; SAITO, M; BUSTOS, J. A; BLANCO, E. M; GONZALVEZ, G; GARCIA, H. H. **Hymenolepis nana infection: symptoms and response to nitazoxanide in field conditions**. Trans R Soc Trop Med Hyg. 101:203-205. 2007.

CISSÉ, M; COULIBALY, S. O; GUIGUEMDÉ, R. T. **Epidemiological features of intestinal parasitic infection in Burkina Faso from 1997 to 2007**. Med Trop. 71(3):257-60. 2011.

CRAGGS, B; DE VOGELAERE, K; DE VOGELAERE, K; WYBO, I; LAUBACH, M; HOORENS, A; DE WAELE, B. **Enterobius vermicularis infection with tuboovarian abscess and peritonitis occurring during pregnancy**. Surg Infect (Larchmt). 10(6):545-7. 2009.

COELHO, W.M.D; GOMES, J.G; AMARANTE, A.F.T; BRESCIANI, K.D.S; LUMINA, G; SHIMIZU, S.H; LEME, D.P; FALCÃO, A.X. **A New Technique for the Diagnosis of Gastrointestinal Parasitosis in Dogs**. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, no prelo. 2012.

CRAUN, G.F; BRUNKARD, J.M; YODER, J.S; ROBERTS, V.A; CARPENTER, J; WADE, T; CALDERON, R.L; ROBERTS, J.M; BEACH, M.J; ROY, S.L. **Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006**. Clin Microbiol Rev. 23(3):507-28. 2010.

DAMEN, J.G.; LUKA, J.; BIWAN, E.I.; LUGOS, M. **Prevalence of Intestinal Parasites among Pupils in Rural North Eastern, Nigeria**. Niger Med J. 52(1):4-6. 2011.

DATASUS (Sistema Único de Saúde). **Pesquisa de Assistência Médica Sanitária**, 2002.

DEL BRUTTO, O. H. **Neurocysticercosis: a review**. ScientificWorldJournal. 2012:159821. 2012.

DIEMERT, D. J; BETHONY, J. M; HOTEZ, P. J. **Hookworm vaccines**. Clin Infect Dis. 15;46(2):282-8. 2008.

DOLD, C. & HOLLAND, C. V. **Ascaris and ascariasis**. Microbes Infect. 13(7):632-7.2011.

DOMINGUES, A. L; MEDEIROS, T. B; LOPES, E. P. **Ultrasound versus biological markers in the evaluation of periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni***. Mem Inst Oswaldo Cruz. 106(7):802-7. 2011.

ELBAKRI, A; SAMIE, A;EZZEDINE, S. ODEH, R.A. **Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* in fecal samples by nested PCR in the United Arab Emirates (UAE)**. Acta Parasitol.58(2):185-90. 2013.

ESCOBEDO, A.A; CAÑETE, R; NÚÑEZ, F.A. **Prevalence, risk factors and clinical features associated with intestinal parasitic infections in children from San Juan y Martínez, Pinar del Río, Cuba**. West Indian Med J. 57(4):377-82. 2008.

FALCÃO, A. X, GOMES, J. F; HOSHINO-SHIMIZU, S; SUZUKI, C.T.N. **Método de preparação de amostra coproparasitológica fecal e composição clarificante**. Brasil Concessão de patente 018100037856. 2010. Mai 25.

FATHY, F. M. **A study on *Blastocystis hominis* in food-handlers: diagnosis and potential pathogenicity**. J Egypt Soc Parasitol. 41(2): 433-53. 2011.

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**. Jornal Brasileiro de Parasitologia, 25: 241-262, 1939.

FEINSTEIN, A. R.. **The architecture of clinical research**. Philadelphia: W.B. Saunders Co., Clinical Epidemiology. 1985.

FIOCRUZ. **Fiocruz lança produto de combate à esquistossomose**. 2008. Disponível em <<http://portal.fiocruz.br/pt-br/node/2592>>. Acesso em Janeiro de 2013.

FOUAMNO KAMGA, H.L.; SHEY NSAGHA, D.; SUH ATANGA, M.B.; LONGDOH NJUNDA, A.; NGUEDIA ASSOBO, J.C.; NDE FON, P.; AKWI FOMUMBOD, S. **The impact of health education on the prevalence of faecal-orally transmitted parasitic infections among school children in a rural community in Cameroon**. Pan Afr Med J. 8:38. 2011.

FUNDAÇÃO ROCKFELLER. **Relatório anual 1992**. New York-N.Y., 1992.

FUNASA. **100 anos de saúde pública: Saneamento.** nº1 p.16 jan. 2004. Disponível em <http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/files_mf/revista100anos.pdf>. Acesso em setembro de 2012.

GALEN, R. S. & GAMBINO, S. R. **Beyond Normality: The Predictive Value and Efficiency of Medical Diagnosis.** John Wiley & Sons, Nova York, U.S.A., 1975.

GARCIA, L. S. **Diagnostic Medical Parasitology**, 5th ed, ASM Press, Washington, DC. 2007.

GARCIA, L. S. **Practical Guide to Diagnostic Parasitology.** 2 ed. ASM Press. 2009.

GOMES, J. F. **Processamento de amostras fecais e desenvolvimento da técnica de análises de imagens por computador, para diagnóstico das enteroparasitoses.** (Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas / UNICAMP - Instituto de Biologia), 2008.

GOMES, J. F.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; DIAS, L.C; ARAUJO, A. J; CASTILHO, V. L; NEVES, F. A. **Evaluation of a novel kit (TF-Test) for the diagnosis of intestinal parasitic infections.** J Clin Lab Anal. 18(2):132-8. 2004.

GOMES, J. F.; SHIMIZU, S. H.; FALCÃO, A. X. **Recentes Avanços Tecnológicos no Exame Parasitológico de Amostras de Fezes.** Bio Farma: Rev. Téc.Cient. Farm. Bioquím. Anal. Clín. Toxicol. 3(6): 44-53. 2008.

GOMES, J. F; SUZUKI, C. T. N; PAPA, J. P; HOSHINO-SHIMIZU, S; FALCÃO, A. X. **Toward automation of the diagnosis of enteroparasitosis via computational image analysis.** Medimond s.r.l., Pianoro, v. M815L5, p. 169-174, 2010.

GONÇALVES, A, L; BELIZÁRIO, T. L; PIMENTEL, J. B; PENATTI, M. P; PEDROSO, R. S. **Prevalence of intestinal parasites in preschool children in the region of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil.** Rev Soc Bras Med Trop. 44(2):191-3. 2011.

GONZÁLEZ-MORENO, O; DOMINGO, L; TEIXIDOR, J; GRACENEA, M. **Prevalence and associated factors of intestinal parasitisation: a cross-sectional study among outpatients with gastrointestinal symptoms in Catalonia, Spain.** Parasitol Res. 108(1):87-93. 2010.

GRAHAM, C. F. **A device for the diagnosis of *Enterobius vermicularis*.** Am. J. Trop. Med. (21): 159-161. 1941

GUIDETTI, C; RICCI, L; VECCHIA, L. **Prevalence of intestinal parasitosis in Reggio Emilia (Italy) during 2009.** Infez Med. 1;18(3):154-61. 2010.

HARHAY, M. O; HORTON, J. OLLIARO, P. L. **Epidemiology and control of human gastrointestinal parasites in children.** Expert Rev Anti Infect Ther. 8(2): 219–234. 2010.

HLAVSA, M.C; ROBERTS, V.A; ANDERSON, A.R; HILL, V.R; KAHLER, A.M; ORR, M; GARRISON, L.E; HICKS, L.A; NEWTON, A; HILBORN, E,D; WADE, T.J; BEACH, M.J;

YODER, J.S; CDC. **Surveillance for waterborne disease outbreaks and other health events associated with recreational water --- United States, 2007--2008**. MMWR Surveill Summ. 23;60(12):1-32. 2011.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. **The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni**. Journal Public of Health, 9: 281-298, 1934.

HOLVECH, J.C; EHRENBERG, J.P; AULT, S.K; ROJES, R; VASQUEZ,J; CERQUEIRA, M.T et al. **Prevention, control, and elimination of neglected diseases in the Americas: Pathways to integrated, inter-programmatic, inter-sectoral action for health and development**. BMC Public Health. 7(6):1-21. 2007.

HOSHINO-SHIMIZU, S.; GOMES, J. F. & DIAS, L. C. **Parasitos Intestinais: Técnicas Tradicionais e Conjuntos Comerciais**. São Paulo (SP), J. Bras. Parasitol. 37(4) 44, 2001.

HOSHINO-SHIMIZU, S; GOMES, J. F; DIAS, L. C. S.; ARAUJO, A. J. U. S; CASTILHO, V. L. P. & NEVES, F. A. M. A. **Deteção de Enteroparasitoses em Amostras Fecais Provenientes de Diferentes Localidades do Estado de São Paulo, Utilizando a Técnica de TF-Test**. Rev. Bras. Anal. Clín. 35(2): 46, 2003.

IBGE -Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. **Pesquisa de Assitência Médica Sanitária**. 2002.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. **Indicadores Sociodemográficos de Saúde no Brasil**. Rio de Janeiro. 2009.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. **Censo Demográfico 2010: Aglomerados subnormais**. Rio de Janeiro. 2010.

JIMENEZ-GONZALES, D.E; MARTINEZ-FLORES, W.A; REYES-GORDILLO, J; RAMIREZ-MIRANDA, M.E; ARROYO-ESCALANTE, S; ROMERO-VALDOVINOS, M; STARK, D; SOUZA,-SALDIVAR, V; MARTINEZ-HERNANDES, F; FLISSER, A; OLIVO-DIAS, A; MARAVILLA, P. **Blastocystis infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population**. Parasitol Res. 110(3):1269-75. 2012.

KAPPAGODA, S; SINGH, U; BLACKBURN, B.G. **Antiparasitic Therapy**. Mayo Clin Proc. 86(6): 561–583. 2011.

KATO, K; MIURA, M. **Comparative examinations**. Jap. J. Parasitol., 3:35, 1954. (Texto em Japonês).

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. Parasitol., 56: 1030-1033, 1970.

KONGS, A; MARKS, G; VERLÉ, P; VAN DER STUYFT, P. **Limitations of Kato-Katz technique for evaluating *S. mansoni* infections.** Trop Med Int Health. 6: 163-169. 2001.

KORKES, F; KUMAGAI, F. U; BELFORT, R. N; SZEJNFELD, D; ABUD, T. G; KLEINMAN, A; FLOREZ, G. M; SZEJNFELD, T; CHIEFFI, P. P. **Relationship between intestinal parasitic infection in children and soil contamination in an urban slum.** J Trop Pediatr. 55(1): 42-5. 2009.

LUMINA, G; GOMES, J.F; AMARANTE, A. F. T; HOSHINO-SHIMIZU, S; DIAS, L. C. S; BRITTO, L. M. P; GODOY, M. S. **Detecção de Parasitos Intestinais em Cães com o Kit TF-Test.** In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, v.34, p. esp.coprop.- esc.coprop. 2005.

LUTZ, A. O. ***Schistosoma mansoni* e a schistosomose, segundo observações feitas no Brasil.** Memória do Instituto Oswaldo Cruz, 11: 121-155, 1919.

MACLURE, M. & WILLET, W.C. **Misinterpretation and Misure of the *Kappa* Statistic.** Amer. J. Epidemiol. 126: 161-169, 1987.

MAIA, M. M; FASTO, M. A.; VIEIRA, E. L; BENETTON, M. L; CARNEIRO, M. **Intestinal parasitic infection and associated risk factors, among children presenting at outpatient clinics in Manaus, Amazonas state, Brazil.** Ann Trop Med Parasitol. 103(7): 583-91. 2009.

MARTÍN-RABADÁN, P; MARTÍNEZ-RUIZ, R; CUADROS, J; CAÑAVATE, C. **Clinical microbiology laboratory and imported parasitic diseases.** Enferm Infecc Microbiol Clin. 28(10):719-25. 2010.

MARVA, E; GROSSMAN, T. **Laboratory tests for parasitic diseases in Israel.** Harefuah. 149(9):585-6, 619. 2010.

MENDES, C. R; TEIXEIRA, A. T; PEREIRA, R. A; DIAS, L. C. **Estudo comparativo de técnicas parasitológicas: Kato-Katz e coprotest®.** Rev Soc Bras Med Trop. 38(2):178-80. 2005.

MINAMOTO, K; MASCIE-TAYLOR, C.G; KARIM, ; MOJI, K; RAHMAN, M. **Short- and long-term impact of health education in improving water supply, sanitation and knowledge about intestinal helminths in rural Bangladesh.** Public Health. 126(5):437-40. 2012.

MIRDHA, B. **Human strongyloidiasis: often brushed under the carpet.** Trop Gastroenterol. 30(1):1-4. 2009.

MOLINA, N, PEZZANI, B, CIARMELA, M, ORDEN, A, ROSA, D; APEZTEGUÍA, M; BASUALDO, J; MINVIELLE, M. **Intestinal parasites and genotypes of *Giardia intestinalis* in school children from Berisso, Argentina.** J Infect Dev Ctries. 27;5(7): 527-34. 2011.

MONTES, M; SANCHEZ, C; VERDONCK, K; LAKE, J; GONZALEZ, E; LOPEZ, G, et al. **Regulatory T cell expansion in HTLV-1 and strongyloidiasis co-infection is associated with**

reduced IL-5 responses to *Strongyloides stercoralis* antigen. PLoS Negl Trop Dis. 3(6):e456. 2009.

MONTES, M; SAWHNEY, C; BARROS, N. ***Strongyloides stercoralis*: there but not seen.** Curr Opin Infect Dis. 23(5):500-4. 2010.

MORRONE, F. B; CARNEIRO, J. A; REIS, C; et al. **Study of enteroparasites infection frequency and chemotherapeutic agents used in pediatric patients in a community living in Porto Alegre, RS, Brazil.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 46, n. 2, p. 77-80, 2004.

MURPHY, S. C; HOOGESTRAAT, D. R; SENGUPTA, D. J; PRENTICE, J; CHAKRAPANI, A; COOKSON, B. T. **Molecular diagnosis of cystoisosporiasis using extended-range PCR screening.** J Mol Diagn. 13(3):359-62. 2011.

NEIRA, O. P; BARTHEL, M. E; WILSON, L.G; MUÑOZ, S. N. ***Isospora belli* infection in HIV positive patients: report of two cases and literature review.** Rev Chilena Infectol.27(3): 219-27. 2010.

NISKA, R.W; SLOAND, E. **Ambulatory medical care in rural Haiti.** J Health Care Poor Underserved. 21(1):70-80. 2010.

OZYURT, M; KURT, O; YAMAN, O; ARDIÇ, N; HAZNEDAROGLU, T. **Evaluation of intestinal parasites in a period of four years in the coprology laboratory of a training hospital.** Turkiye Parazitol Derg. 31(4): 306-8. 2007.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION & WORLD HEALTH ORGANIZATION. **French-Speaking Caribbean: Towards World Health Assembly Resolution 54.19.** Kingston, Jamaica, 15-17 May, 2007.

PESSOA, S. B; **Problemas brasileiros de higiene rural.** 1 vol., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1949.

PESSOA, S. B. **Endemias parasitárias da zona rural brasileira.** Fundo Editorial Prociencx, São Paulo. 1963.

PEZZANI, B. C; MINVIELLE, M. C; CIARMELA, M. L; APEZTEGUÍA, M. C; BASUALDO, J. A. **Community participation in the control of intestinal parasitosis at a rural site in Argentina.** Rev Panam Salud Publica. 26(6): 471-7. 2009.

PEZZANI, B. C; MINVIELLE, M. C.; LUCA, M. M.; CÓRDOBA, M. A.; APEZTEGNIA, M. C.; BASUALDO, J. A. ***Enterobius vermicularis* infection among population of General Mansilla, Argentina.** World J Gastroenterol, 10(17): 2535-2539, 2004.

POIRIER, P; WAWRZYNIAK, I; VIVAÈS, C. P; DELBAC, F; EL ALAOUI, H. **New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome.** PLoS Pathog. 8(3):e1002545. 2012.

RAGUNATHAN, L; KALIVARADHAN, S. K; RAMADASS, S; NAGARAJ, M; RAMESH, K. **Helminthic infections in school children in Puducherry, South India.** J Microbiol Immunol Infect. 43(3): 228-32. 2010.

RALSTON, K.S; PETRI, W.A. N. **The ways of a killer: how does *Entamoeba histolytica* elicit host cell death?** Essays Biochem. 51:193-210. 2011.

REBOLLA, M. F. **Inquérito parasitológico, comparação de técnicas de diagnóstico fecal, controle e prevenção de *Giardia* em creches e pré-escolas, São Sebastião da Gramma, São Paulo.** (Dissertação de Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas / UNICAMP - Instituto de Biologia). 2012.

REY, L. **Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais.** 4ª ed. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan. 2008.

RIBEIRO, D. **O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil.** 2 ed. São Paulo: Cia. das Letras. 1995.

RITCHIE, L. S. **An ether sedimentation technique for routine stool examination.** Bulletin of the United States Army Medical Department. (8):326. 1948.

RUGAI, E; MATTOS, T; BRISOLA, A. P. **Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes-modificação do método de Baermann.** Revista do Instituto Adolfo Lutz, 14: 5-8, 1954.

ROTHMAN, K. J. & BOICE, J. D. **Epidemiologic Analysis With a Programmable Calculator.** Epidemiology Resources Inc., Boston, M.A., U.S.A., 1982.

SANTOS, S. A.; MERLINI, L. S. **Prevalence of enteroparasitosis in the population of Maria Helena, Paraná State.** Cien Saude Colet. 15(3):899-905. 2010.

SARDA, A.K; MITTAL, R; BASRA, B.K; MISHRA, A; TALWAR, N. **Three cases of amoebic liver abscess causing inferior vena cava obstruction, with a review of the literature.** Korean J Hepatol. 17(1):71-5. 2011.

SAYASONE, S; MAK, T. K; VANMANY, M; RASPHONE, O; VOUNATSOU, P; UTZINGER, J; AKKHAVONG, K; ODERMATT, P. **Helminth and intestinal protozoa infections, multiparasitism and risk factors in Champasack province, Lao People's Democratic Republic.** PLoS Negl Trop Dis. 12;5(4): 1037. 2011.

SEJDINI, A; MAHMUD, R; LIM, Y. A; MAHDY, M; SEJDINI, F; GJONI, V; XHAFERRAJ, K; KASMI, G. **Intestinal parasitic infections among children in central Albania.** Ann Trop Med Parasitol. 105(3): 241-50. 2011.

SHAH, M; TAN, C. B; RAJAN, D; AHMED, S; SUBRAMANI, K; RIZVON, K; MUSTACCHIA, P. ***Blastocystis hominis* and *Endolimax nana* Co-Infection Resulting in Chronic Diarrhea in an Immunocompetent Male.** Case Rep Gastroenterol. 6(2):358-364. 2012.

SURESH, K. & SMITH, H. **Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*.** Europ. J. clin. Microbiol. infect. Dis. 23:509-511. 2004.

TAN, K. S. W; SINGH, M; YAP, E. H. **Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita.** Int. J. Parasit. 32: 789-804. 2002.

TANNER, S; LEONARD, W.R; MCDADE, T.W; REYES-GARCIA, V; GODOY, R; HUANCA, T. **Influence of helminth infections on childhood nutritional status in lowland Bolivia.** Hum Biol. 21(5):651-6. 2009.

TENGGU, S. A; NORHAYATI, M. **Public health and clinical importance of amoebiasis in Malaysia: a review.** Trop Biomed. 28(2):194-222. 2011.

TRABELSI, S; AOUINET, A; KHALED, S. **Procedure and indications of stool examination in parasitology.** Tunis Med. 90(6):431-4. 2012.

UHLMANN, S; GALANIS, E; TAKARO, T; MAK, S; GUSTAFSON, L; EMBREE, G; BELLACK, N; CORBETT, K; ISAAC-RENTON, J. **Where's the pump? Associating sporadic enteric disease with drinking water using a geographic information system, in British Columbia, Canada, 1996-2005.** J Water Health. 7(4):692-8. 2009.

USTÜN, S; TURGAY, N. ***Blastocystis hominis* and bowel diseases.** Turkiye Parazitolo Derg. 30(1):72-6. 2006.

VAVRICKA, S. R; MANZ, M; BURRI, E. ***Trichuris trichiura* (whipworm).** Clin Gastroenterol Hepatol. 7(10): A16. 2009.

VINHA, C. **Incidência de Ancilostomídeos, *Ascaris* e *Trichuris* no Brasil.** Rev. Bras. Malar., n.21, p. 549-57, 1969.

WHO - World Health Organization. **Training Manual on Diagnosis of Intestinal Parasites.** Geneva. 2004.

WHO - World Health Organization. **Partners for Parasite Control.** 2009.

WILLIS, H. H. **A simple levitation method for the detection of hook-worm ova flagellates.** Med J Aust, 29:375-376. 1921.

YAMADA, H; MATSUDA, K; AKAHANE, T; SHIMADA, R; HORIUCHI, A; SHIBUYA, H; AOYAGI, Y; NAKAMURA, K; HAYAMA, T; IINUMA, H; NOZAWA, K; ISHIHARA, S; WATANABE, T. **A case of fulminant amebic colitis with multiple large intestinal perforations.** Int Surg. 95(4): 356-9. 2010.

YODER, J. S; HARRAL, C; BEACH, M. J. **Giardiasis surveillance - United States, 2006-2008.** MMWR Surveill Summ. 11;59(6): 15-25. 2010.