

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

STEVEEN RIOS RIBEIRO

**COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS COPROPARASITOLÓGICAS
PARA O DIAGNÓSTICO DE PROTOZOÁRIOS E HELMINTOS
INTESTINAIS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA**

VITÓRIA

2011

STEVEEN RIOS RIBEIRO

**COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS COPROPARASITOLÓGICAS
PARA O DIAGNÓSTICO DE PROTOZOÁRIOS E HELMINTOS
INTESTINAIS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA**

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

Orientadora: Dra. Cinthia Furst Leroy Gomes Bueloni

Co-orientador: Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

VITÓRIA

2011

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

R484c Ribeiro, Steveen Rios, 1983-
Comparação de técnicas coproparasitológicas para o diagnóstico de protozoários e helmintos intestinais de importância médica / Steveen Rios Ribeiro. – 2011. 104 f. : il.

Orientadora: Cinthia Furst Leroy Gomes Bueloni.
Co-Orientador: Fausto Edmundo Lima Pereira.
Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Exame de fezes. 2. Intestinos - Parasitos. 3. Schistosoma mansoni. I. Bueloni, Cinthia Furst Leroy Gomes. II. Pereira, Fausto Edmundo Lima. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



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

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

O mestrando STEVEEN RIOS RIBEIRO apresentou dissertação intitulada: “COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS COPROPARASITOLÓGICAS PARA O DIAGNÓSTICO DE PROTOZOÁRIOS E HELMINTOS INTESTINAIS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA” em sessão pública, no dia 18 de março de 2011, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu **aprovar sem restrições**, a dissertação e habilitar o farmacêutico STEVEEN RIOS RIBEIRO, a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória-ES, 18 de março de 2011

Prof. Dr. Naftale Katz
(Membro Externo)

Prof. Dr. Reynaldo Diétze
(Membro Interno)

Prof. Dra. Cinthia Furst Leroy Gomes
(Orientadora)

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
(Co-Orientador)

Dedicatória

Aos meus pais, Carlos e Eliana e ao meu irmão Slin, pelo amor incondicional.

Aos familiares e amigos, pela confiança e carinho.

... E você aprende que realmente pode suportar... Que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor, e que você tem valor diante da vida.

William Shakespeare

Agradecimentos

A Deus, pela vida, força e vontade de vencer.

A minha orientadora, Dra. Cinthia, que acreditou no meu potencial e me incentivou a desenvolver esse projeto. Obrigado pela confiança.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Fausto, pelo incentivo, apoio, carinho, dedicação, sempre presente em todos os momentos da pesquisa. Sou muito grato pela oportunidade de ter sido co-orientado por um dos pesquisadores que mais admiro e respeito.

A grande amiga, Dra. Adriana Oliveira Costa, pela ajuda e incentivo em todas as etapas desse estudo.

Aos meus pais, Carlos e Eliana e meu irmão, Slin, pelo amor incondicional.

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

Aos meus amigos do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Cassiano Antonio de Moraes, em especial Marco Antônio, Cleber Vieira, Rose, Jane e Zelina, por me ensinarem a paixão pela Parasitologia e por todo apoio necessário para condução desse estudo.

Aos meus amigos do Laboratório de Parasitologia da UFES, em especial Adelson, Nica, Etelvina e Claudinei, por todos os momentos que passamos juntos no laboratório e por todo incentivo, amizade e força para conduzir a pesquisa.

Aos professores do Mestrado de Doenças Infecciosas, pelos ensinamentos durante nossa formação.

A professora Dra. Angélica Espinosa pelo carinho, compreensão e por me ajudar em todos os momentos de dificuldade.

A grande amiga Fátima Aparecida que sempre me ajudou e nunca deixou que nada atrapalhasse o meu trabalho.

A cada estagiário que passou pelo laboratório de parasitologia, em especial aos amigos Sara, Fabiana, Marcos, Maria Augusta, Cynara, Julyana e Ana Paula, por todos os momentos juntos foram eles trabalhando ou almoçando em algum lugar de Vitória. Obrigado Parasetes!

A todos os meus colegas de mestrado por dois anos de muito companheirismo.

A minha amiga e colega de mestrado Elisa Laignier, pelo carinho e sempre ao meu lado.

A todos os indivíduos que muito gentilmente aceitaram participar dessa pesquisa.

A Universidade Federal do Espírito Santo.

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

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) pelo suporte financeiro essencial a condução desse projeto.

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

RESUMO

Introdução. O diagnóstico de parasitoses intestinais pode ser realizado por diferentes técnicas de Exame Parasitológico de Fezes (EPF), cada uma com vantagens e desvantagens de acordo com o parasito a ser identificado.

Objetivos. Comparar técnicas tradicionais de EPF (Sedimentação Espontânea em Tubo, Kato-Katz e Baermann-Moraes) com técnicas mais sofisticadas (cultura de fezes, detecção de coproantígenos e PCR) e dois kits comerciais disponíveis no Brasil (Paratest® e TF-Test®).

Material e Métodos. Amostras de fezes de 160 indivíduos, totalizando 356 amostras, foram analisadas por técnicas tradicionais de EPF (Sedimentação Espontânea em Tubo, Kato-Katz e Baermann-Moraes), cultura de fezes frescas e de sedimento de fezes, técnicas para detecção de coproantígenos nas fezes, PCR para detecção e diferenciação de *Entamoeba* do complexo *histolytica/dispar* e dois kits comerciais disponíveis no Brasil (Paratest® e TF-Test®).

Resultados. A técnica de Sedimentação Espontânea em Tubo demonstrou melhor sensibilidade (80,43% das ocorrências) para o diagnóstico de ovos e larvas de helmintos nas fezes. O Kato-Katz foi melhor para identificação de ovos do *S. mansoni* (100% das ocorrências). Já o método de Baermann-Moraes detectou larvas de *Strongyloides stercoralis* de modo semelhante à sedimentação espontânea. Para o diagnóstico de *G. lamblia*, *C. parvum* e *E. histolytica*, os kits de coproantígenos demonstraram melhor sensibilidade. A cultura de fezes mostrou excelentes resultados para identificação de *Blastocystis hominis*. O PCR conseguiu identificar e diferenciar as amebas do complexo *E. histolytica/E. dispar*. Os dois kits comerciais apresentaram sensibilidade mais baixa do que a Sedimentação Espontânea em Tubo para o diagnóstico de helmintos, mas o Paratest® foi a técnica que demonstrou melhor sensibilidade para protozoários (66,66% das ocorrências).

Conclusão. Para o diagnóstico de helmintos o método de Sedimentação Espontânea em Tubo foi o que mostrou melhor resultado, exceto para detecção de ovos de *S. mansoni*, melhor detectados pelo Kato-Katz. Os kits de detecção de coproantígenos foram melhores para diagnóstico de *G. lamblia*, *Cryptosporidium parvum* e *E. histolytica*. Entretanto, o kit para diagnóstico de *E. histolytica* não detecta a espécie *E. dispar*, melhor identificada pelo PCR. Os kits comerciais (Paratest®

e TF-Test®), apesar de facilitarem a coleta e conservação da amostra, têm menor sensibilidade do que a Sedimentação Espontânea em Tubo.

Palavras chaves: Exame de Fezes; Parasitos intestinais; *Schistosoma mansoni*.

ABSTRACT

Introduction. The diagnosis of intestinal parasites can be accomplished by different techniques of parasitological stool examinations (EPF), each with advantages and disadvantages according to the parasite to be identified. **Aims.** The aim of the present study was to compare traditional techniques of EPF (Spontaneous Sedimentation in Tube, Kato-Katz and Baermann-Moraes) with more sophisticated techniques (stool culture, detection of coproantigen and PCR) and two commercially available kits in Brazil (Paratest® and TF-Test®). **Material and Methods.** Faecal samples from 160 individuals, a total of 356 samples, were analyzed by traditional techniques of EPF (Spontaneous Sedimentation in Tube, Kato-Katz and Baermann-Moraes), culture of fresh faeces and sediment of feces, detection of coproantigen, PCR for detection and differentiation of the complex *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* and two commercially available kits in Brazil (Paratest® and TF-Test®). **Results.** The technique of Spontaneous Sedimentation in Tube had better sensitivity (80.43% of occurrences) for the diagnosis of eggs and larvae of helminths in feces. The Kato-Katz was better for identification of eggs of *S. mansoni* (100% of cases). The method of Baermann-Moraes found larvae of *Strongyloides stercoralis* detected similarly to spontaneous sedimentation. For the diagnosis of *G. lamblia*, *C. parvum* and *E. histolytica*, kits for detection of coproantigen showed better sensitivity. The stool culture showed excellent results for identification of *Blastocystis hominis*. The PCR was able to identify and differentiate the amoebas of the complex *E. histolytica/ E. dispar*. Both commercial kits showed lower sensitivity than the spontaneous sedimentation for the diagnosis of helminths, but Paratest® was the technique that has shown better sensitivity for protozoa (66.66% of cases). **Conclusion.** For the diagnosis of helminths, the Spontaneous Sedimentation Method in Tube showed better results, except for detection of eggs of *S. mansoni*, best detected by Kato-Katz. For the diagnosis of *G. lamblia*, *E. histolytica* and *Cryptosporidium parvum*, kits for detection of coproantigen were better. However, the kit for the diagnosis of *E. histolytica* does not detect the species *E. dispar*, best identified by the

PCR. The commercial kits (Paratest® and TF-Test ®), while facilitating the collection and preservation of the sample, have lower sensitivity than the Spontaneous Sedimentation method in Tube.

Key words: feces exam, intestinal parasites, *Schistosoma mansoni*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotomicrografias obtidas através de microscópio ótico a partir da visualização de sedimentos de amostras analisadas aos pares pela Sedimentação Espontânea em Tubo (SE), Paratest® (Pt) ou TF-Test® (TF). Ovos de ancilostomídeos pela SE (A) e Pt (B). Cistos de *E. histolytica/E. dispar* pela SE (C) e Pt (D). Ovos de *E. vermicularis* pela SE (E) e Pt (F). Ovos de *S. mansoni* pela SE (G) e TF (H). Larvas de *S. stercoralis* pela SE (I) e Pt (J). As figuras A, B, E, F, G, H, I e J foram tomadas com aumento de 450X e as figuras C e D com 900X..... pg. 41

Figura 2 – Fluxograma detalhando o número de indivíduos com resultado combinado positivo e negativo para parasitos e comensais..... pg. 42

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Resultado combinado (positivo em pelo menos umas das técnicas) e resultados positivos para helmintos e protozoários, observados em cada uma das técnicas utilizadas no exame coproparasitológico de 160 indivíduos (uma a três amostras por indivíduo)..... pg. 43

Tabela 1. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Ascaris lumbricoides* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz e Paratest®..... pg. 45

Tabela 2. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Trichuris trichiura* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz e Paratest®..... pg. 46

Tabela 3. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Enterobius vermicularis* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz e Paratest®..... pg. 47

Tabela 4. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de Ancilostomídeos em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz e Paratest®..... pg. 48

Tabela 5. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Hymenolepis nana* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz e Paratest®..... pg. 49

Tabela 6. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Schistosoma mansoni* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz e Paratest®..... pg. 50

- Tabela 7. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Paratest® e Baermann-Moraes..... pg. 51
- Tabela 8. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Isospora belli* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest®..... pg. 52
- Tabela 9. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Giardia lamblia* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest®..... pg. 53
- Tabela 10. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Paratest®, Cultura de fezes frescas (Cultura F) e Cultura de sedimento de fezes (Cultura S)..... pg. 54
- Tabela 11. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Entamoeba coli* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest®..... pg. 55
- Tabela 12. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Endolimax nana* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest®..... pg. 56
- Tabela 13. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Iodamoeba buschtlii* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest®..... pg. 57
- Tabela 14. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Blastocystis hominis* dentre as 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas

de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Paratest®, Cultura de fezes frescas (Cultura F) e Cultura de sedimento de fezes (Cultura S)..... pg. 58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	pg. 20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	pg. 21
3. OBJETIVOS.....	pg. 32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	pg. 33
4.1. Amostra.....	pg. 33
4.2. Recebimento e preparação das amostras para execução das técnicas coproparasitológicas.....	pg. 33
4.3. Técnicas coproparasitológicas utilizadas.....	pg. 34
<u>4.3.1. Sedimentação Espontânea em Tubo.....</u>	<u>pg. 34</u>
<u>4.3.2. Baermann-Moraes.....</u>	<u>pg. 35</u>
<u>4.3.3. Kato Katz.....</u>	<u>pg. 35</u>
<u>4.3.4. Kits comerciais.....</u>	<u>pg. 35</u>
<u>4.3.5. Semeadura de fezes frescas em meio de cultivo Pavlova (específico para <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i> e <i>Blastocystis hominis</i>).....</u>	<u>pg. 36</u>
<u>4.3.6. Semeadura de sedimento de fezes em meio de cultivo Pavlova (específico para <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i> e <i>Blastocystis hominis</i>).....</u>	<u>pg. 36</u>
<u>4.3.7. Detecção de coproantígenos.....</u>	<u>pg. 36</u>
<u>4.3.8. PCR para <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>Entamoeba dispar</i>.....</u>	<u>pg. 37</u>
<u>4.3.8.1. Purificação dos sedimentos por técnica de gradiente de Sacarose.....</u>	<u>pg. 37</u>
<u>4.3.8.2. Extração de DNA.....</u>	<u>pg. 37</u>
<u>4.3.8.3. Amplificação do DNA.....</u>	<u>pg. 38</u>

4.4. Análise Estatística.....	pg. 38
5. RESULTADOS.....	pg. 40
5.1. Avaliação de amostras de 160 indivíduos por 12 técnicas coproparasitológicas.....	pg. 40
<u>5.1.1. Características da amostra.....</u>	pg. 40
<u>5.1.2. Análise macroscópica.....</u>	pg. 40
<u>5.1.3. Análise microscópica.....</u>	pg. 40
<u>5.1.3.1. Comparação da sensibilidade de diferentes métodos na identificação de helmintos pela análise das amostras de cada indivíduo.....</u>	pg. 44
<u>5.1.3.2. Comparação da sensibilidade dos métodos de Sedimentação Espontânea em Tubo, Paratest® e TF-Test® na identificação de protozoários parasitos e comensais nas amostras de cada indivíduo.....</u>	pg. 44
<u>5.1.3.3. Análise da sensibilidade dos métodos de Sedimentação Espontânea em Tubo, Kato-Katz, Paratest®, TF-Test® e cultura de fezes para o diagnóstico de cada espécie de helminto ou protozoário.....</u>	pg. 44
<u>5.1.3.4. Análise da sensibilidade dos métodos de detecção de coproantígeno para diagnóstico de <i>Giardia lamblia</i>, <i>Cryptosporidium parvum</i> e <i>Entamoeba histolytica</i>.....</u>	pg. 59
<u>5.1.3.5. Análise da sensibilidade do PCR específico para diagnóstico de <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>Entamoeba dispar</i> nas fezes.....</u>	pg. 59
6. DISCUSSÃO.....	pg. 60
6.1. Análise crítica da amostra utilizada.....	pg. 60
6.2. Análise qualitativa das amostras utilizadas.....	pg. 61

6.3. Avaliação dos métodos de Sedimentação Espontânea em Tubo, Kato-Katz, Paratest® e TF-Test® para identificação de helmintos e protozoários.....	pg. 62
6.4. Avaliação dos métodos de Sedimentação Espontânea em Tubo, Kato-Katz, Paratest® e TF-Test® para identificação de <i>Schistosoma mansoni</i>.....	pg. 63
6.5. Avaliação dos métodos de Sedimentação Espontânea em Tubo, Kato-Katz, Paratest®, TF-Test® e Baermann-Moraes para identificação de larvas de <i>Strongyloides stercoralis</i>.....	pg. 63
6.6. Avaliação dos métodos de Sedimentação Espontânea em Tubo, cultura de fezes frescas, cultura de sedimento de fezes, Paratest® e TF-Test® para o diagnóstico de <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i> e <i>B. hominis</i>.....	pg. 64
6.7. Avaliação dos kits comerciais para identificação de coproantígenos com os métodos de microscopia direta.....	pg. 65
6.8. O uso de PCR para diagnóstico e diferenciação de <i>Entamoeba</i> do complexo <i>histolytica/dispar</i>.....	pg. 66
6.9. Análise crítica dos métodos em relação à sua execução e praticidade.....	pg. 66
<u>6.9.1. Sedimentação Espontânea em Tubo.....</u>	pg. 66
<u>6.9.2. Baermann-Moraes.....</u>	pg. 66
<u>6.9.3. Kato-Katz.....</u>	pg. 67
<u>6.9.4. Cultura de fezes frescas e cultura de sedimento de fezes.....</u>	pg. 68
<u>6.9.5. Kits para diagnóstico de coproantígeno.....</u>	pg. 68
<u>6.9.6. PCR.....</u>	pg. 68
<u>6.9.7. Paratest®.....</u>	pg. 70
<u>6.9.8. TF-Test®.....</u>	pg. 70

7. CONCLUSÃO..... pg. 72

8. REFERÊNCIAS..... pg. 73

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose e parasitoses intestinais decorrentes de protozoários e/ou helmintos ainda são consideradas um problema de saúde pública principalmente em países em desenvolvimento, visto que as condições de saneamento básico e redes de tratamentos de esgoto não fazem parte de um contexto ideal às necessidades primárias de higiene destinadas à população (FREI et al., 2008).

O diagnóstico destas doenças pode ser realizado pelo exame das fezes. Os estágios usuais de diagnóstico são os ovos ou as larvas de helmintos e os trofozoítos, cistos, oocistos e esporos de protozoários. Contudo, uma identificação segura e correta de um parasito depende de critérios morfológicos, os quais estão sujeitos a uma colheita bem feita com uma boa preservação dos espécimes fecais e da escolha mais adequada das técnicas de diagnóstico (DE CARLI, 2007).

Outro fator que pode alterar o resultado dos exames de fezes é a intermitência da eliminação de estágios de certos parasitos a partir do hospedeiro e distribuição não uniforme dos estágios evolutivos. Isto diminui a possibilidade de encontrar parasitos intestinais, que pode ser aumentada pelos exames de amostras múltiplas (HIATT et al., 1995). As características biológicas das diversas formas evolutivas do parasito também são importantes para escolha de técnicas, que levam em consideração a densidade das formas evolutivas e seu tamanho (CRINGOLI et al., 2010).

Diante de diversas espécies, sua prevalência, estágios evolutivos, necessidade de amostragem múltipla, variedade e viabilidade das técnicas, um Exame Parasitológico de Fezes (EPF), preciso e acurado, é de extrema importância para o diagnóstico de parasitos intestinais. Considerando esses fatores, propomos comparar as técnicas tradicionais para diagnóstico parasitológico de fezes (sedimentação espontânea, Kato-Katz, Baermann-Moraes), com novos kits comerciais disponíveis no Brasil (Paratest® e TF-Test®), cultura de fezes, detecção de coproantígenos e PCR específico para amebas do complexo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Apesar da existência de inúmeros métodos, qualitativos e quantitativos, destinados ao Exame Parasitológico de Fezes (EPF), muito se discute e diversas são as críticas com relação à complexidade, baixa sensibilidade e elevado custo de execução, restringindo suas utilizações na rotina laboratorial de EPF (CHAVES et al., 1979).

A comparação da eficiência dos diferentes métodos de exame tem sido alvo de vários grupos de pesquisadores como Faust et al. (1939), Hoffman et al. (1948), Katz et al. (1972), buscando uma metodologia mais acurada para o diagnóstico parasitológico de fezes (CHAVES et al., 1979). A comparação entre diferentes métodos como Koga Agar, Kato-Katz, concentração em éter e FLOTAC tem sido feita ainda nos dias de hoje, buscando o conhecimento de uma metodologia que possua melhor precisão no diagnóstico de *Schistosoma mansoni* e outros vermes transmissíveis de importância médica (GLINZ et al., 2010).

A obtenção de alta qualidade com relação ao diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias requer o desenvolvimento de técnicas multivalentes que se caracterizam pela alta sensibilidade, especificidade, exatidão, precisão, reprodutibilidade e a capacidade de rapidamente detectar e permitir o controle de problemas de saúde pública tanto humana quanto animal (CRINGOLI et al., 2010).

Para melhor compreensão das técnicas utilizadas, suas características e principais modificações, será feita uma breve revisão da literatura sobre os principais métodos coproparasitológicas utilizados para o diagnóstico de protozoários e helmintos que possuem relevância no quadro de saúde pública.

2.1. Sedimentação espontânea

A técnica de sedimentação espontânea tem sido utilizada desde os estudos de Pirajá da Silva em 1909, para identificação do *S. mansoni* no Brasil, que anteriormente era realizado por meio de autópsias, com a visualização e

detecção de vermes adultos. Considerando que uma das etapas do ciclo de vida do parasito é a eliminação de ovos, Lutz concluiu que a identificação destes nas fezes seria a forma mais fácil de identificar o verme. Baseado nesse fato, o autor realizou o diagnóstico do parasito por meio da lavagem das fezes, seguido de uma sedimentação ou centrifugação. Também, o autor utilizou telas de arame ou musselina para peneirar as fezes e reter corpos maiores que os ovos. Desse modo era obtido um sedimento que continha, quase que exclusivamente, glóbulos de amido e ovos do parasito que eram facilmente achados por meio da observação microscópica (LUTZ, 1919).

Em 1934, Hoffman, Pons e Janer adotaram o mesmo princípio da técnica de LUTZ, porém propuseram algumas modificações que buscariam maior praticidade para o laboratório de análises e também aumentariam a sensibilidade e acurácia da técnica. Tais modificações foram: (a) uso de uma quantidade superior a um grama de fezes, colhidas de várias partes do bolo fecal e homogeneizadas em copo graduado ou Becker com adição de água isenta de bolhas de ar (acreditava-se que o ar poderia promover uma diminuição da densidade dos ovos e cistos, fazendo com que isso demandasse maior tempo de sedimentação); (b) filtração do homogeneizado por meio de gaze dobrada duas vezes e coletado em um copo cônico com capacidade de 125 ml e adição de água corrente até completar aproximadamente $\frac{3}{4}$ do volume; (c) execução de mais de uma sedimentação para diminuição da turbidez da solução e facilitar o achado dos estágios evolutivos;

Alguns anos após a publicação do trabalho de Hoffmann, Pons e Janer, os pesquisadores Faust, Ingalls e See (1946) recomendaram a substituição da água corrente por uma solução aquosa de glicerina a 0,5% (v/v), para diminuir a tensão superficial e aumentar o número de organismos depositados no fundo do copo cônico por meio da sedimentação. Admitiram que a melhora significativa no diagnóstico foi devida aos seguintes efeitos da glicerina: (a) atuar como bom agente emoliente, permitindo uma alta porcentagem de decantação dos ovos presentes no espécime fecal para o fundo do copo de sedimentação, conseqüentemente uma pequena perda dos ovos que seriam descartados durante as sedimentações subseqüentes; (b) não provocar um inchaço no sedimento de fezes como faziam os detergentes, sulfato de sódio,

hidróxido de potássio e alumínio, permitindo dessa forma que um grande número de ovos presente na amostra se concentrasse em uma pequena porção de sedimento; (c) preservar os ovos em todos os estágios de maturidade e degeneração no mesmo estado e proporção que existiam na amostra não processada.

Em 2011, Ribeiro e col¹ aprimoraram a técnica de sedimentação espontânea e propuseram a utilização de tubos cônicos de polipropileno com volume de 50 ml ao invés dos tradicionais cálices de sedimentação para realização do método de HPJ. A modificação proposta demonstrou excelente concordância com a tradicional técnica de sedimentação, além de oferecer vantagens importantes como a utilização de tampas de rosca para vedação dos compartimentos contendo os sedimentos de fezes, diminuindo a contaminação entre as amostras do laboratório ou por agentes externos (formigas e moscas). Também foi possível reduzir o mau cheiro, que pôde contribuir para minimizar a atração de insetos em locais de diagnóstico, condição importante para o controle de qualidade. Houve uma redução do espaço utilizado, considerando que os tubos cônicos foram mantidos em suportes compactos, reduzindo o risco de acidentes e melhorando a segurança durante a rotina do laboratório.

2.2. Métodos de preservação e coloração de espécimes para o diagnóstico parasitológico

Em 1953, Saperó e Lawless desenvolveram uma técnica baseada na preservação e coloração de espécimes, por meio de uma solução de mertiolate, iodo e formaldeído (MIF). Essa técnica demonstrou diversas vantagens em relação às outras técnicas de coloração, pois era mais simples e de baixo custo na preparação; rápida fixação e coloração; preservava as amostras coletadas em trabalhos de campo, domésticos ou ambientes nosocomiais, antes que os estágios parasitários se degenerassem.

¹ No prelo

Atualmente, soluções de formalina tamponada vêm sendo utilizadas como método de conservação de amostras fecais tanto na preparação e execução dos tradicionais métodos parasitológicos como também parte da metodologia de diversos kits comerciais (KATAGIRI et al., 2010).

2.3. Sedimentação por centrifugação utilizando conservantes

Blagg et al. (1955) desenvolveram uma técnica para o diagnóstico de parasitos intestinais que consistia em misturar a amostra fecal com o MIF; filtrar o homogeneizado com gaze (colocada em um tubo de 15 ml para centrifugação), adicionar 4 ml de éter, tampar e agitar vigorosamente. Após esse processo, a tampa era removida e o tubo era centrifugado por 1 minuto a 1600 rpm. Retirava-se a camada de detritos fecais vertendo rapidamente o tubo, descartando todo o sobrenadante, exceto o sedimento, que era então homogeneizado. Segundo os autores, essas modificações promoviam uma melhor concentração dos ovos e cistos no sedimento.

2.4. Concentração por flutuação

Baseado nas propriedades que alguns ovos de helmintos possuem de flutuar em solução com densidade elevada e de aderirem ao vidro, Willis propôs em 1921 uma técnica simples e fácil indicada para o diagnóstico de ovos com densidade específica baixa, não sendo recomendada, então, para ovos pesados, como os de *Ascaris lumbricóides*. Uma pequena quantidade de fezes (1 a 2 g) deveria ser homogeneizada com solução saturada de Cloreto de Sódio (NaCl) em recipiente com capacidade aproximada de 20 ml. O volume do recipiente deveria ser completado até haver uma total homogeneização da suspensão. Uma lamínula (22 x 22 mm) ou uma lâmina era colocada sobre a borda do recipiente, estando em contato direto com o menisco da suspensão. Após 20 minutos, removia-se a lamínula ou lâmina que era examinada ao microscópio ótico. A técnica de Willis é contra-indicada para a visualização de cistos de protozoários, já que esses se retraem, ficando irreconhecíveis devido

à solução saturada utilizada no procedimento (WILLIS, 1921 apud DE CARLI, 2007).

2.5. Concentração por centrífugo-flutuação

Faust et al. (1939) propuseram uma técnica também de flutuação que seria mais eficaz na visualização e diagnóstico tanto de protozoários como de helmintos intestinais. A técnica consistia no centrífugo-flutuação com utilização de sulfato de zinco (densidade 1,18g/ml). Essa nova técnica promoveria uma maior concentração dos organismos, separação dos estágios evolutivos do material fecal e recuperação dos estágios em condição necessária para um diagnóstico específico.

Após alguns anos, em 1946, Faust propôs metodologias para diagnóstico de ovos de *S. mansoni* baseadas na flutuação por centrifugação com sulfato de zinco e também o uso de centrifugação com éter. Essas técnicas propuseram uma melhoria na concentração, visualização e conservação dos ovos.

2.6. Concentração de larvas

Em 1876, o parasito *Strongyloides stercoralis* foi encontrado e descrito pela primeira vez em soldados franceses que retornaram da Conchinchina. Desde então, métodos destinados ao diagnóstico desse verme vem sendo desenvolvidos e melhorados com a finalidade de um diagnóstico acurado e preciso (NEVES, 2009).

O método original do funil de Baermann foi concebido para isolamento de larvas de nematóides do solo. A técnica consistia em envolver a amostra com tecido ou papel absorvente, submergindo parte do conjunto em um funil cheio de água. De acordo com o hidrotropismo positivo dos nematóides, esses se movimentavam do material mais saturado (amostra) em direção à água, passando pela base do pescoço do funil, onde poderiam ser recuperados. Para realização da técnica, era necessário um funil com 10 centímetros de diâmetro com uma borracha em forma de tubo acoplada ao final do pescoço. Utilizava-se

uma braçadeira ou grampo para vedar a borracha acoplada ao funil. Despejava-se água na parte superior do funil até que ultrapassasse cerca de um centímetro acima do nível do fundo da tela quando esta se encontrava posicionada no lugar. A haste do funil era pressionada para drenar uma quantidade de água para remover as bolhas de ar. Colocava-se a amostra de solo envolvida no tecido ou papel absorvente sobre uma tela de nylon (100 a 250 μm de abertura) que possuía diâmetro de 7,5 centímetros e estava inserida dentro do funil, funcionando com uma base para recebimento da amostra. Ajustava-se o volume da água. A amostra de solo deveria estar completamente saturada de água, mas não completamente imersa. A boca do funil era coberta com um pedaço de plástico ou com uma tampa de placa de Petri e este aparato era incubado por sete dias. Após este tempo, liberava-se a braçadeira e drenava 20 ml de água do funil para um tubo de ensaio grande. Deixava-se descansar durante uma hora para que os nematóides se depositassem no fundo dos tubos. Desprezava-se o sobrenadante, reservando de 5 a 10 ml do fundo, dependendo do tamanho das câmaras de contagem a serem utilizadas. Aguardavam-se alguns minutos para decantação dos nematóides (CARTER, 2006).

Moraes (1948) propôs a modificação do método de Baermann para a pesquisa de *S. stercoralis* nas fezes humanas, baseado no termo e hidrotropismo positivo das larvas deste nematóide. Na técnica descrita por Moraes, o tubo de borracha do aparelho era conectado a um tubinho de hemólise de 80 x 9 milímetros (6 cm^3). No interior do funil, abaixo da borda, posicionava-se uma tela de arame (em substituição a tela de nylon proposta por Baermann), recortada e adaptada em forma de cesta de acordo com as dimensões do funil, sobre a qual se colocava um pedaço de gaze dobrada de uma a quatro vezes. Para execução do método, eram colocadas 10 g de fezes espalhadas no interior do funil sobre a gaze, enchendo-se o funil com água aquecida na temperatura de 40-42°C, de tal modo que as fezes ficavam em parte imersas na água. Após 60 minutos, as larvas abandonavam o bolo fecal e passavam para o tubo de hemólise. O exame era realizado em microscópio entomológico, vertendo todo o líquido do tubo de hemólise para um vidro de relógio côncavo, de cinco a oito centímetros de diâmetro. Caso a amostra fosse positiva, as

larvas eram facilmente vistas pela sua motilidade, mesmo com as lentes de menor aumento (4x).

2.7. Métodos para avaliação quantitativa de ovos

Objetivando o exame direto para a pesquisa de ovos de helmintos, Kato e Miura em 1954, relataram um método mais simples e eficaz para visualização de ovos de parasitos intestinais no exame coprológico. Esse método foi testado em grande escala para avaliar a sua sensibilidade e aplicabilidade, propondo a utilização de uma pequena quantidade de fezes sobre lâmina, coberta com uma lamínula de vidro sobre outra de celofane embebida em solução de verde malaquita a 3%. O conjunto era prensado com uma folha de borracha macia, fazendo com que a amostra fecal se espalhasse por toda a lâmina até atingir as margens do celofane, formando uma fina camada translúcida (KOMIYA et al., 1966).

Em 1972, baseado na técnica de Kato, Katz e colaboradores desenvolveram um cartão retangular (3 cm x 4 cm x 1.37 mm) contendo um orifício de 6 mm no centro que permitia avaliar uma quantidade conhecida de fezes (aproximadamente 0,04 g), visando quantificar ovos de *S. mansoni*. As lâminas eram invertidas sobre papel celofane embebido em verde malaquita e pressionadas, formando uma fina camada que se espalhava sobre uma área de 20-25 mm de diâmetro. A quantidade de ovos era contada em cada lâmina e o número de ovos por grama de fezes era obtido. A metodologia proposta recebeu a denominação de método de Kato-Katz e passou a ser considerado o padrão ouro para diagnóstico qualitativo e quantitativo de ovos de *S. mansoni* nas fezes. Como o método possibilita a visualização de ovos de outros parasitos, ele também é indicado para diagnóstico de outras helmintíases (WHO, 1997).

2.8. Cultivo de fezes (ou sedimento) para identificação de protozoários intestinais

A cultura de protozoários é utilizada como técnica de diagnóstico, principalmente para pesquisa *Acanthamoeba spp* (causadora de ceratites e encefalites) e de *Trichomonas vaginalis*, que habita o trato urogenital. O cultivo de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* é uma forma de diagnóstico destas espécies, considerando que o meio utilizado é seletivo. No entanto, não é possível diferenciar as duas espécies, assim como na observação de cistos dessas amebas, presentes nas fezes. Outra aplicação do cultivo da *E. histolytica/E. dispar* é para realização da eletroforese de isoenzima, que permite a caracterização da sua patogenicidade, como também de outras técnicas que permitem a diferenciação das espécies (ex. eritrofagocitose). Para protozoários intestinais como *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* existem meios de cultivo disponíveis, mas não com o objetivo específico de diagnóstico.

2.9. Cultivo de fezes para identificação de larvas de nematóides

Harada e Mori (1955) foram os primeiros a identificar larvas de nematóides por meio do cultivo de fezes. O método baseava-se na emergência das larvas presentes na amostra fecal cultivada em uma das extremidades do papel filtro que possuía, na extremidade oposta, água em contato. Baseado na sua capacidade de locomoção, as larvas rhabditóides migram das fezes em direção à água, que, após 10 a 14 dias, à temperatura ambiente de 25°C a 30°C, evoluindo para larvas filarióides, podendo ser observadas em microscópio ótico.

Outra técnica de cultura de fezes para isolamento e identificação de larvas de *S. stercoralis* desenvolvida por Arakaki e Koga (1990) foi um grande avanço no diagnóstico da estrogiloidíase. Baseado na capacidade de locomoção das larvas, uma pequena amostra fecal era posicionada no centro de uma placa contendo ágar cuja composição proporcionava um ambiente favorável à evolução e desenvolvimento das larvas rhabditóides em larvas filarióides num

período de 48 horas à temperatura ambiente (24°C a 28°C). Ao se movimentarem, as larvas arrastavam bactérias fecais que se dividiam, formando colônias visíveis ao longo das trilhas percorridas na superfície do ágar. As placas podiam ser observadas em microscópio invertido e a confirmação final era realizada lavando-se o ágar com formalina a 10% e procedendo ao exame direto do sedimento concentrado lavado.

2.10. Pesquisa de antígenos de parasitos nas fezes

Tradicionalmente, a pesquisa de formas evolutivas nas fezes (ovos, larvas, cistos, oocistos e trofozoítos) ainda é considerada o padrão ouro para diagnóstico da maioria dos parasitos intestinais. Entretanto, o diagnóstico coproparasitológico requer profissionais treinados e uma metodologia bem executada (ten HOVE et al., 2009). Objetivando o aumento da sensibilidade no diagnóstico das parasitoses intestinais, diminuição dos erros que podem gerar um impacto negativo no resultado, metodologias que se baseiam na pesquisa de antígenos nas fezes também têm sido desenvolvidas, testadas e aplicadas como formas alternativas e de melhor custo-benefício para diagnóstico de vários parasitos, dentre eles *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum*.

Para o diagnóstico específico de *Entamoeba histolytica*, apenas a microscopia não é suficiente, já que os cistos e os trofozoítos da *E. histolytica* e da *E. dispar* são morfologicamente idênticos (WHO, 1997). Portanto, métodos como a detecção de coproantígenos são indispensáveis para um diagnóstico específico (ten HOVE et al., 2009). Resultados obtidos com kits comerciais de coproantígeno foram comparados com os resultados de exames parasitológicos convencionais e concluiu-se que os kits foram de fácil execução e consumiram menos tempo para realização, além da obtenção de ótimos valores de sensibilidade e especificidade (WEITZEL et al. 2006).

2.11. Pesquisa de material genético de parasitos nas fezes

Assim como a pesquisa de antígenos de parasitos nas fezes, o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido uma ferramenta importante para o diagnóstico e principalmente para a pesquisa parasitológica (WHO, 1997).

Para alguns parasitos intestinais, as técnicas de biologia molecular já vêm sendo realizada com sucesso, como é o caso da *E. histolytica*. Garfinkel et al. (1989) e Tannich et al. (1989) identificaram seqüências específicas de DNA desta ameba, que posteriormente foram utilizadas em vários laboratórios como sondas para detecção de espécies patogênicas e não patogênicas de amebas. Tachibana et al. (1991) utilizaram as sondas descritas anteriormente para identificação de isolados de culturas de *E. histolytica* pela PCR.

Em 1993, Diamond et al. basearam-se em evidências bioquímicas, imunológicas e genéticas (PCR), citadas e descritas na literatura, para redescrever *E. histolytica* Schaudinn, 1903. Diante das inúmeras evidências analisadas, Diamond et al. concluíram que *E. histolytica* é um complexo de duas espécies: *E. histolytica* (Schaudinn, 1903), espécie de ameba patogênica invasora da mucosa intestinal e outra espécie não-patogênica, *E. dispar* (Brumpt, 1925), incapaz de produzir doença.

Entretanto, a identificação das amebas do complexo *histolytica/dispar* pela técnica de PCR só era possível por meio do cultivo da ameba, o que demandava vários dias para obtenção de quantidade suficiente de trofozoítos. Além disso, o cultivo *in vitro* da ameba falhava em alguns momentos, inviabilizando os estudos (RIVERA et al., 1996). Diante dessas condições, Rivera et al. (1996) propuseram a utilização do PCR no diagnóstico da *Entamoeba* usando DNA extraído diretamente de cistos de amebas presentes nas fezes, avaliando a sensibilidade da técnica.

Recentemente, a pesquisa de material genético esta sendo proposta também para parasitos cuja detecção possa ser mais difícil pelos exames coprológicos convencionais, especialmente para detecção de *S. stercoralis* e *S. mansoni*. (OLIVEIRA et al., 2010).

2.12. Novos kits comerciais para diagnóstico parasitológico de fezes

Diante do advento pela busca de novas metodologias mais eficazes e práticas, outras técnicas foram surgindo no mercado com o objetivo de facilitar a rotina laboratorial de EPF. Uma delas, o TF-Test® (*Triple Fecal Test*), foi originalmente desenvolvido no Brasil para diagnóstico de fezes humanas no qual três amostras fecais são coletadas em recipientes contendo solução de formalina a 5% tamponada, unidas e duplamente filtradas e concentradas por centrifugação (KATAGIRI et al., 2010).

Outro kit disponível no Brasil, o Paratest®, promete facilitar o EPF desde a coleta da amostra, realizando a conservação e diluição em formalina a 5% tamponada, como também a concentração dos espécimes fecais após a filtragem da solução em uma tela de 266 micras, ofertando um sedimento para a análise microscópica. A nova metodologia é destinada a realizar muito mais exames em um reduzido espaço físico e de tempo, a um custo baixo com relação aos métodos tradicionais de EPF.

Uma nova metodologia denominada FLOTAC (não disponível no Brasil), vem sendo testada e comparada como métodos de concentração e quantitativos, tanto para amostras frescas como para preservadas. O FLOTAC é um aparato formado por duas câmaras de flutuação escavadas em uma base cilíndrica com capacidade para 5 ml, que permite a análise microscópica de até 1 g de fezes. O dispositivo é feito com termoplástico de policarbonato devido sua excelente transmissão de luz, alta resistência ao calor, robustez (podendo ser lavado e reutilizado diversas vezes) e alta estabilidade dimensional. Todo o procedimento requer, aproximadamente, de 12 a 15 minutos de preparação antes da análise microscópica (CRINGOLI et al., 2010).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Comparar 12 técnicas coproparasitológicas para diagnóstico de helmintos e protozoários.

3.2. Objetivos Específicos

- Comparar a utilização dos métodos de Sedimentação Espontânea em Tubo, Kato-Katz, Baermann-Moraes, Paratest® e TF-Test® para diagnóstico de helmintos nas 356 amostras de fezes.
- Comparar a utilização dos métodos de Sedimentação Espontânea em Tubo, Paratest®, TF-Test®, cultura de fezes frescas, cultura de sedimento de fezes, kits de detecção de coproantígeno para *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* e *Entamoeba histolytica* (kits TECHLAB®), PCR específico para *E. histolytica* e *E. dispar*, para diagnóstico de protozoários nas 356 amostras de fezes.
- Avaliar e comparar qualitativamente os novos kits comerciais (Paratest® e TF-Test®) disponíveis no Brasil para diagnóstico de parasitos em fezes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostra

Foram incluídos nesse estudo amostras de fezes de 160 indivíduos procedentes dos municípios de Vitória, Vila Velha e Cariacica (Espírito Santo – Brasil) arrolados no projeto intitulado “Epidemiologia da *Entamoeba histolytica* e da *Entamoeba dispar* no estado do Espírito Santo e avaliação da patogenicidade dos isolados dessas amebas”, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Espírito Santo (número 04/07), sob coordenação da professora Dr^a. Cinthia Furst Leroy Gomes Bueloni. Todos os pacientes foram esclarecidos e aqueles que aceitaram participar da pesquisa assinaram o TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I). Também foram incluídas amostras de fezes de pacientes atendidos no laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes – HUCAM/UFES, procedimento também aprovado pelo CEP.

4.2. Recebimento e preparação das amostras para execução das técnicas coproparasitológicas

Foram incluídos 160 indivíduos nesta etapa. Cada pessoa recebeu três frascos coletores estéreis e foi orientada a proceder a coleta das fezes a fresco em dias alternados e entregar as amostras assim que fossem coletadas.

As fezes frescas (356 amostras) foram macroscopicamente analisadas para determinação de características como: consistência (dura, formada/pastosa ou diarréica); presença de sangue, secreção purulenta ou muco; presença de algum elemento que pudesse indicar contaminação como urina ou material ambiental (pedras, folhas, gravetos); e presença de helmintos adultos ou partes deles, como proglotes.

Para a realização das 12 técnicas foi obedecida a seguinte ordem de procedimentos: o frasco de fezes frescas foi aberto dentro da capela de fluxo laminar e com uma espátula estéril foi retirada uma porção e semeada em meio de cultura Pavlova (Pavlova, 1938, modificado por Silva, 1972, ANEXO II). O restante do material foi alicotado para as técnicas de Kato-Katz, Baermann-Moraes, Sedimentação Espontânea em Tubo, Paratest® e TF-Test®. As fezes também foram alicotadas em tubos tipo *Eppendorf* (1,5 ml) para posterior realização das técnicas de coproantígeno e congeladas em freezer a -20°C. O material sedimentado no tubo também foi utilizado para semeadura no meio de cultura e também para purificação das fezes para PCR em sacarose.

O mesmo material fecal foi analisado microscopicamente e cada sedimento foi analisado utilizando três lâminas com lamínula 24 x 32 mm, examinadas sob microscópio ótico no mesmo dia e pelo mesmo examinador, utilizando lugol como corante, com exceção de cultura. Para a técnica de Kato-Katz foram preparadas 3 lâminas de cada amostra.

4.3. Técnicas coproparasitológicas utilizadas

4.3.1. Sedimentação Espontânea em Tubo

Uma alíquota de fezes foi preparada para a sedimentação em tubo Falcon® de 50 ml. A amostra foi homogeneizada com água filtrada e passada por gaze dobrada em 4 vezes para o tubo. O volume foi completado e o sobrenadante foi descartado após uma hora de sedimentação. Este processo foi repetido 2 vezes a fim de clarificar o material. Para cada sedimento, 3 lâminas (lamínula de 24 x 32 mm) foram examinadas sob microscópio ótico no mesmo dia e pelo mesmo examinador, utilizando lugol como corante.

4.3.2. Baermann-Moraes

Foi utilizado o aparato de Baermann-Moraes (suporte, funil de vidro, pinça de Mohr, gaze, tubos cônicos, centrífuga) a temperatura ambiente. Para execução, o funil de vidro foi preenchido com água a 45°C. A pinça de Mohr foi aberta com o objetivo de deixar escorrer uma pequena quantidade de água para evitar a formação de bolhas de ar na haste e no tubo de borracha. Foi colocada de 8 a 10 g de fezes da amostra sobre uma gaze dobrada em quatro, formando-se uma pequena trouxa que foi levemente pressionada sobre uma folha de papel, achatando-se a base a fim de aumentar a superfície de contato com a água. A trouxa foi posicionada sobre a superfície da água sem provocar sua imersão, objetivando formar duas zonas com temperaturas diferentes: a água a 45° e as fezes à temperatura ambiente. O conjunto foi deixado em repouso durante, por 60 minutos e, após esse tempo, todo líquido foi coletado em tubo cônico Falcon® e centrifugado a 1500 rpm durante um minuto. O sedimento foi recolhido (mesmo quando não havia formação de sedimento visível a olho nu) e três lâminas foram observadas a microscópio ótico com objetiva no aumento de 10x.

4.3.3. Kato Katz

O método de Kato-Katz foi realizado utilizando um kit comercial (helm-TEST®, Bio-Manguinhos/Fiocruz) segundo instruções do fabricante.

4.3.4. Kits comerciais

Os métodos de Paratest® e TF-Test® foram realizados de acordo com instruções do fabricante de cada kit.

4.3.5. Semeadura de fezes frescas em meio de cultivo Pavlova (específico para *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* e *Blastocystis hominis*)

A semeadura a fresco em meio de cultivo Pavlova (segundo Silva, 1972; anexo II) foi a primeira metodologia realizada após o recebimento de cada amostra. Essa técnica foi realizada em capela de fluxo laminar com auxílio de espátula estéril descartável, transportando-se uma alíquota de aproximadamente 1g de fezes do recipiente de coleta da amostra para o interior dos tubos contendo o meio Pavlova. Após a semeadura, os tubos foram mantidos em estufa a 36°C e o cultivo foi verificado a cada 24 horas (até 7 dias).

4.3.6. Semeadura de sedimento de fezes em meio de cultivo Pavlova (específico para *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* e *Blastocystis hominis*)

Essa técnica foi realizada dentro de capela de fluxo laminar, semeando uma amostra 0,5 ml de sedimento (proveniente da sedimentação em tubo tipo Falcon®), em um tubo contendo meio de cultivo Pavlova. Após a semeadura, os tubos foram mantidos a 36° C e o cultivo foi verificado no período de 24, 48 horas e 7 dias.

4.3.7. Detecção de coproantígenos

Para diagnóstico de *E. histolytica*, *G. lamblia* e *Cryptosporidium parvum* foram utilizados kits comerciais (TECHLAB® Inc. Blacksburg, VA), de acordo com as instruções do fabricante. Para leitura das placas, foi utilizado o leitor de ELISA THERMO PLATE, com filtro de 450 nm. Valores de absorbância acima de 0,150 nm foram considerados positivos.

4.3.8. PCR para *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*

A técnica de PCR foi realizada reunindo os sedimentos provenientes da sedimentação espontânea em tubo, já descrita acima. Quando havia mais de uma amostra, os sedimentos de cada amostra eram misturados em um único tubo. Dessa forma, a PCR foi sempre realizada em “pool” de amostras de cada indivíduo.

4.3.8.1. Purificação dos sedimentos por técnica de gradiente de Sacarose

Foi utilizado o protocolo de purificação de fezes utilizado por Roberts- Thomson (1976), com modificações (TANAKA, 2008¹). O sedimento de fezes resultante da sedimentação foi centrifugado 3 vezes (400 x g por 5 minutos) com água destilada e suspenso em 4 ml. Esta suspensão foi lentamente gotejada em 5 ml de sacarose 1M, em tubos de centrifugação de 15 ml. Após centrifugação (400 x g, 15 minutos) a interface sacarose/água foi recolhida com pipeta, lavada por centrifugação com água destilada três vezes (400 x g, 5 minutos) e suspenso em 1 ml de água destilada. A amostra foi transferida para microtubo de 1,5 ml, centrifugada (1000 x g, 5 min), o sobrenadante descartado, deixando-se cerca de 200 µl.

4.3.8.2. Extração de DNA

Foi empregada a técnica de lise alcalina descrita por Vianna et al. (2009). Cada amostra recebeu 200µL de polivinilpirrolidona (PVPP) a 4% incubadas a 99°C por 10 minutos, e em seguida foram adicionados 200 µl de tampão de lise (glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0 e EDTA 10 mM). Após manutenção das amostras à temperatura ambiente por 5 minutos, 400 µl de NaOH 0,2M com 1% de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) foram acrescentados. Cinco ciclos de congelamento em gelo seco (5 minutos) e descongelamento a 99° C foram

¹ Carolina Lumi Tanaka desenvolveu esta metodologia de purificação de cistos em projeto de Iniciação Científica na Universidade Federal do Paraná, 2008.

realizados, seguidos de incubação no gelo por 5 minutos. 300 µl de acetato de amônio 7,5M foram adicionados à amostra, com incubação em gelo por 20 minutos. A amostra foi centrifugada a 10000 x g por 7 minutos. O sobrenadante resultante deste processo foi transferido para outro microtubo e adicionou-se 500 a 600 µl de etanol 96%. As amostras foram mantidas “overnight” a -20° e centrifugadas a 10000 x g por 17 minutos. O sedimento foi lavado com etanol 70% à 10000 x g por 7 minutos e suspenso em 50µL de água ultra-pura.

4.3.8.3. Amplificação do DNA

Foram utilizados os seguintes primers: (a) para identificar *E. histolytica* foram utilizados os primers Eh-S26C e Eh/Ed-AS25, descritos por BLESSMAN et al (2002), que amplificam uma região de 310 bp do rDNA de *E. histolytica*. Para identificar *E. dispar* foram utilizados os “primers” Ed-27C e Eh/Ed-AS25, que amplificam região do rDNA de *E. dispar*. Neste trabalho, estes dois pares de “primers” foram usados separadamente em reações de PCR específicas para detectar *E. histolytica* e *E. dispar*, conforme descrito por Vianna et al (2009). As reações foram realizadas em 20 µl contendo 2,0 µl de tampão 1X, 0,6 µl de MgCl₂, 1,2 µl de dNTP, 0,53 µl de cada um dos “primers”, 2,0 µl de BSA (bovine serum albumin) e 0,2 µl de Taq Invitrogen®. As condições de reação foram: desnaturação inicial à 95°C, 5 minutos, 40 ciclos de 95°C, 45 segundos; 55°C, 40 segundos e 72°C, 45 segundos; e extensão final à 72° C, 5 minutos. Os produtos de amplificação foram revelados por eletroforese em gel de poliacrilamida 4% corado pela prata.

4.4. Análise Estatística

Os dados foram armazenados no programa Microsoft Office Excel 2007, versão para Windows XP e os cálculos estatísticos foram realizados utilizando os programas EpiInfo versão 6.04 e SPSS 11.5 versão para Windows. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

Para cálculo da sensibilidade de cada teste e para identificação de cada parasito, foi sempre considerado como padrão de comparação (padrão ouro) o resultado combinado, ou seja, o resultado positivo em pelo menos uma das técnicas.

Quando necessário comparar duas técnicas, foi calculado o índice de concordância Kappa (k).

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação de amostras de 160 indivíduos por 12 técnicas coproparasitológicas

5.1.1. Características da amostra

Dos 160 indivíduos, 84 eram do sexo masculino (52,5%) e 76 do sexo feminino (47,5%). Em relação à entrega das amostras solicitadas, 48 entregaram uma única amostra (30%), 28 entregaram duas (17,5%) e 84 entregaram 3 (52,5%), totalizando 356 amostras.

5.1.2. Análise macroscópica

Nenhum parasito adulto ou parte dele (proglotes) foi diagnosticado macroscopicamente. Não houve qualquer indício de elementos que pudessem indicar contaminação com urina ou material ambiental. A análise da consistência das 356 amostras demonstrou que 13 (3,65%) estavam duras, 331 (92,98%) formadas a pastosas e 12 (3,37%) liquefeitas ou diarréicas. Foi observado que 2 amostras (0,56%) apresentaram apenas sangue, 24 (6,74%) apenas muco, 4 (1,12%) sangue e muco e 326 (91,58%) não apresentaram sangue, secreção purulenta ou muco.

5.1.3. Análise microscópica

As técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo, Paratest® e TF-Test® foram as únicas testadas que produzem sedimento. A Figura 1 ilustra o padrão do sedimento obtido a partir dessas técnicas. Como pode ser observado o sedimento mais limpo foi o obtido com a sedimentação em tubo.

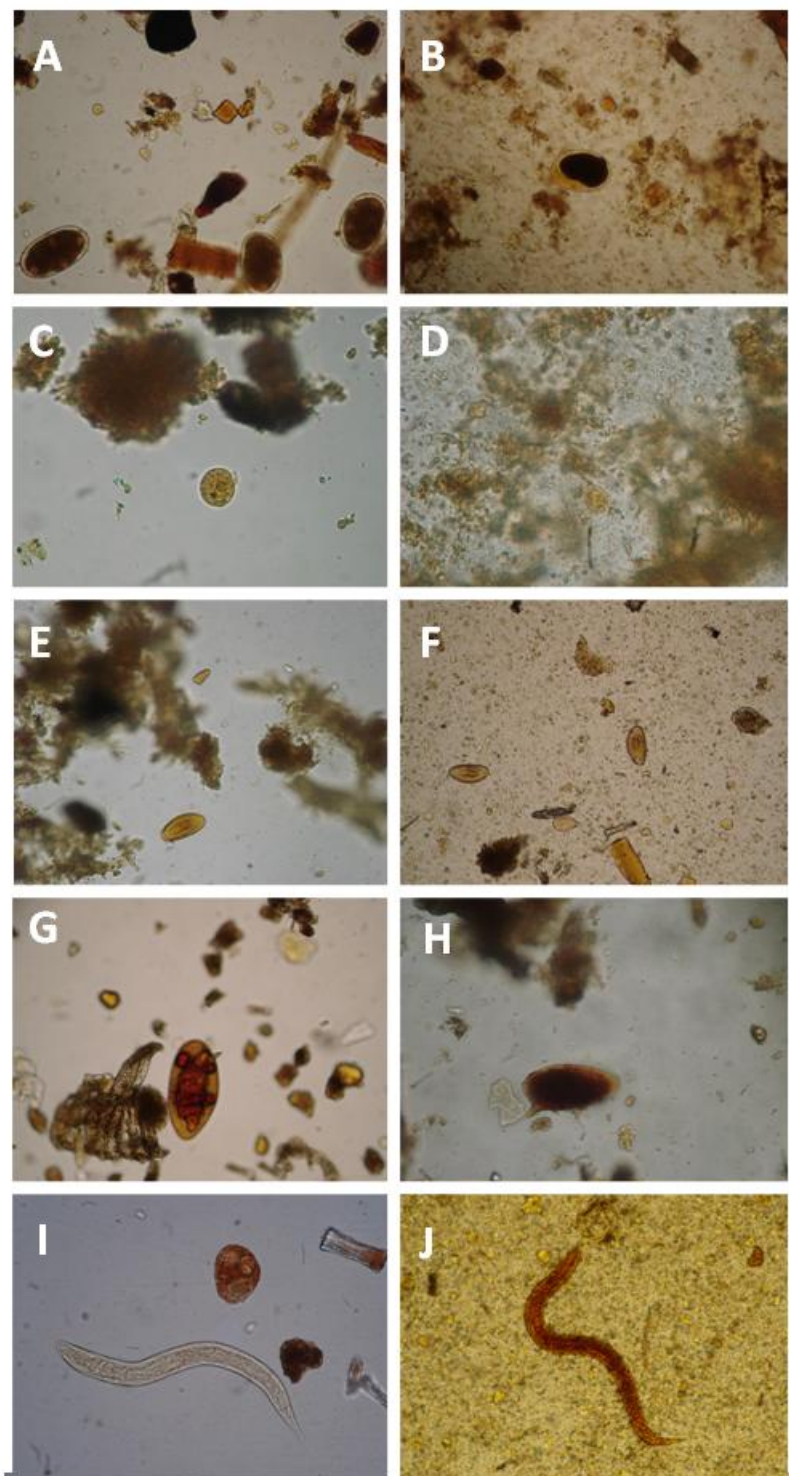


Figura 1 – Fotomicrografias obtidas através de microscópio ótico a partir da visualização de sedimentos de amostras analisadas aos pares pela Sedimentação Espontânea em Tubo (SE), Paratest® (Pt) ou TF-Test® (TF). Ovos de ancilostomídeos pela SE (A) e Pt (B). Cistos de *E. histolytica/E. dispar* pela SE (C) e Pt (D). Ovos de *E. vermicularis* pela SE (E) e Pt (F). Ovos de *S. mansoni* pela SE (G) e TF (H). Larvas de *S. stercoralis* pela SE (I) e Pt (J). As figuras A, B, E, F, G, H, I e J foram tomadas com aumento de 450X e as figuras C e D com 900X.

O resultado combinado, considerado como resultado positivo em pelo menos uma das técnicas testadas, foi utilizado como padrão ouro para os cálculos de sensibilidade. Essa expressão – resultado combinado (RC) – está sendo empregada por autores que comparam técnicas de diagnóstico (VERWEIJ, 2003; STEINMANN, 2007; KNOPP, 2008), por ser mais representativa do que apenas uma técnica adotada como padrão-ouro.

Dos 160 indivíduos, 115 (71,87%) eram positivos para pelo menos uma espécie de parasito ou comensal. Destes, 61 (38,12%) eram positivos para pelo menos 1 parasito e 54 (33,75%) eram positivos para pelo menos 1 comensal (Figura 2).

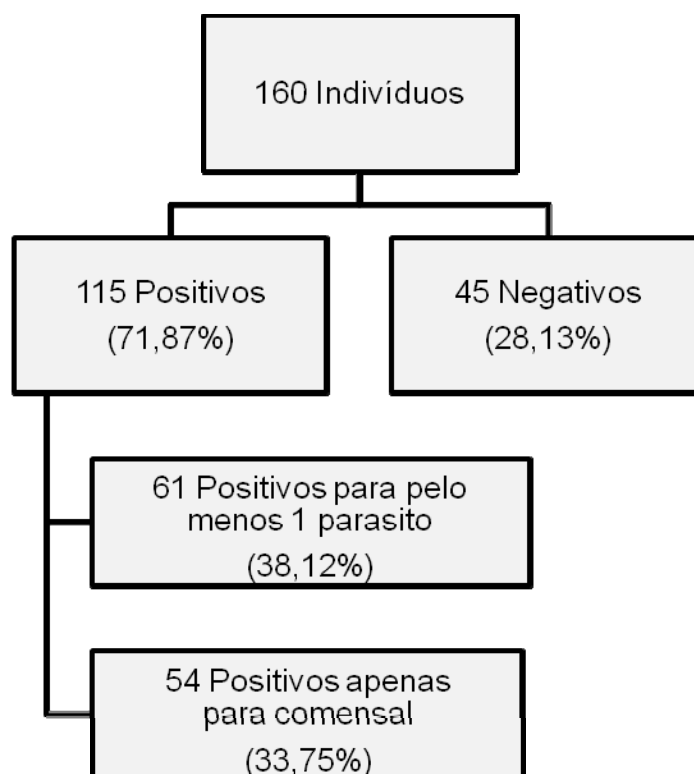


Figura 2 – Fluxograma detalhando o número de indivíduos com resultado combinado positivo e negativo para parasitos e comensais.

O Quadro 1 resume as ocorrências dos diferentes parasitos e comensais diagnosticadas com a utilização dos diferentes métodos. Os números indicam a quantidade de indivíduos positivos em cada método utilizado.

Quadro 1. Resultado combinado (positivo em pelo menos umas das técnicas) e resultados positivos para helmintos e protozoários, observados em cada uma das técnicas utilizadas no exame coproparasitológico de 160 indivíduos (uma a três amostras por indivíduo).

RESULTADO DE CADA TÉCNICA PARA DIAGNÓSTICO DE PARASITOS E COMENSAIS DENTRE OS 160 INDIVÍDUOS													
	RC*	Tubo	Para	TF	KK	BM	K-GI	K-Eh	K-Cryp	Cult F	Cult S	PCR-Ed	PCR-Eh
HELMINTOS													
<i>A. lumbricoides</i>	10	10	9	10	9	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
<i>T. trichiura</i>	11	8	7	7	9	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
<i>E. vermicularis</i>	7	6	2	3	5	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
<i>H. nana</i>	2	2	1	1	0	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Ancilostomídeos	2	2	1	0	0	0	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
<i>S. mansoni</i>	4	2	0	1	4	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
<i>S. stercoralis</i>	10	7	3	2	0	7	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Total	46	37	23	24	27	7	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
PROTOZOÁRIOS													
Parasitos													
<i>I. belli</i>	3	2	2	3	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
<i>G. lamblia</i>	23	14	18	14	Na	Na	22	Na	Na	Na	Na	Na	Na
<i>C. parvum</i>	1	0	0	0	Na	Na	Na	Na	1	Na	Na	Na	Na
<i>E. histolytica/E. dispar</i>	6	3	2	2	Na	Na	Na	1	Na	4	2	5	0
Total	33	19	22	19	Na	Na	22	1	1	4	2	5	0
Comensais													
<i>E. coli</i>	23	22	17	18	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
<i>E. nana</i>	32	20	27	18	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
<i>I. buschtlii</i>	1	1	0	0	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
<i>B. hominis</i>	82	7	39	33	Na	Na	Na	Na	Na	72	42	Na	Na
Total	138	50	83	69	Na	Na	Na	Na	Na	72	42	Na	Na

RC – Resultado Combinado das técnicas para cada espécie; Na – não se aplica; Tubo – Sedimentação Espontânea em Tubo; Para – Paratest®; TF – TF-Test®; KK – Kato-Katz; BM – Técnica de Baermann-Moraes; K-GI – Kit de detecção de coproantígeno para diagnóstico de *G. lamblia*; K-Eh – Kit de detecção de coproantígeno para diagnóstico de *E. histolytica*; K-Cryp – Kit de detecção de coproantígeno para diagnóstico de *C. parvum*; Cult F – Cultura de fezes frescas; Cult S – Cultura de sedimento de fezes; PCR-Ed – PCR específico para *E. dispar*; PCR-Eh – PCR específico para *E. histolytica*.

5.1.3.1. Comparação da sensibilidade de diferentes métodos na identificação de helmintos pela análise das amostras de cada indivíduo

Das 46 ocorrências de helmintos diagnosticados nas amostras de 160 indivíduos, 37 foram detectadas no método de Sedimentação Espontânea em Tubo, 27 no Kato-Katz, 23 no Paratest® e 24 no TF-Test®, com valores de sensibilidade de 80,43%, 58,69%, 50% e 52,17% respectivamente (Quadro 1).

5.1.3.2. Comparação da sensibilidade dos métodos de Sedimentação Espontânea em Tubo, Paratest® e TF-Test® na identificação de protozoários parasitos e comensais nas amostras de cada indivíduo

Das 171 ocorrências de protozoários (parasitos ou comensais) diagnosticados nas amostras de 160 indivíduos, 69 foram detectadas pela sedimentação em Tubo, 105 pelo Paratest® e 88 pelo TF-Test®, e os valores de sensibilidade foram 40,35%, 61,40% e 51,46 respectivamente. Considerando apenas os protozoários parasitos, as sensibilidades foram de 57,57% para a sedimentação em Tubo, 66,66% para o Paratest® e 57,57% para o TF-Test® (Quadro 1).

5.1.3.3. Análise da sensibilidade dos métodos de Sedimentação Espontânea em Tubo, Kato-Katz, Paratest®, TF-Test® e cultura de fezes para o diagnóstico de cada espécie de helminto ou protozoário

Os resultados das amostras positivas para cada espécie de parasito, separados por amostra, estão nos Anexos III a XVI, onde também estão resumidos os cálculos da sensibilidade de cada método tomando como padrão ouro o resultado combinado (RC). Como nem todos os indivíduos entregaram todas as amostras, a sensibilidade foi calculada separadamente para a primeira, segunda e terceira amostras, bem como para o total de amostras examinadas. Como o TF-Test® examina as três amostras em conjunto, os seus resultados não serão comparados por amostra, apenas por indivíduo positivo para cada espécie de helminto e protozoário.

Ascaris lumbricoides (ANEXO III)

A Tabela 1 mostra os resultados de sensibilidade de cada uma das técnicas testadas para o diagnóstico de *A. lumbricoides*.

Tabela 1. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Ascaris lumbricoides* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz e Paratest®.

AMOSTRAS	TÉCNICAS		
	Tubo	Kato-Katz	Paratest®
	Sensibilidade (IC a 95%)		
1ª Amostra	100 (72,25 – 100) (N=160)	90 (59,58 – 98,21) (N=160)	80 (49,02 – 94,33) (N=160)
2ª Amostra	100 (34,24 – 100) (N=112)	50 (9,45 – 90,55) (N=112)	100 (34,24 – 100) (N=112)
3ª Amostra	50 (9,45 – 90,55) (N=84)	50 (9,45 – 90,55) (N=84)	100 (34,24 – 100) (N=84)
TOTAL	92,85 (68,53 – 98,73) (N=356)	78,57 (52,41 – 92,43) (N=356)	85,71 (60,06 – 95,99) (N=356)

De acordo com o número de indivíduos positivos para *A. lumbricoides* pelo resultado combinado das técnicas de Tubo, Kato-Katz e Paratest®, a sensibilidade do TF-Test® foi de 100% (IC a 95%: 72,25 – 100).

Trichuris trichiura (ANEXO IV)

A Tabela 2 mostra os resultados de sensibilidade de cada uma das técnicas testadas para o diagnóstico de *T. trichiura*.

Tabela 2. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Trichuris trichiura* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz e Paratest®.

AMOSTRAS	TÉCNICAS		
	Tubo	Kato-Katz	Paratest®
	Sensibilidade % (IC a 95%)		
1ª Amostra	77,77 (45,26 – 93,68) (N=160)	77,77 (45,26 – 93,68) (N=160)	55,55 (26,67 – 81,12) (N=160)
2ª Amostra	50 (18,76 – 81,24) (N=112)	100 (60,97 – 100) (N=112)	50 (18,76 – 81,24) (N=112)
3ª Amostra	66,66 (20,77 – 93,85) (N=84)	66,66 (20,77 – 93,85) (N=84)	33,33 (6,15 – 79,23) (N=84)
TOTAL	66,66 (43,75 – 83,72) (N=356)	83,33 (60,78 – 94,16) (N=356)	50 (29,03 – 70,97) (N=356)

De acordo com o número de indivíduos positivos para *T. trichiura* pelo resultado combinado das técnicas de Tubo, Kato-Katz e Paratest®, a sensibilidade do TF-Test® foi de 63,63% (IC a 95%: 35,38 – 84,83).

Enterobius vermicularis (ANEXO V)

A Tabela 3 mostra os resultados de sensibilidade de cada uma das técnicas testadas para o diagnóstico de *E. vermicularis*.

Tabela 3. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Enterobius vermicularis* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz e Paratest®.

AMOSTRAS	TÉCNICAS		
	Tubo	Kato-Katz	Paratest®
	Sensibilidade (IC a 95%)		
1ª Amostra	71,42 (35,89 – 91,78) (N=160)	71,42 (35,89 – 91,78) (N=160)	14,28 (2,57 – 51,31) (N=160)
2ª Amostra	0 (0 – 79,35) (N=112)	100 (20,65 – 100) (N=112)	0 (0 – 79,35) (N=112)
3ª Amostra	66,66 (20,77 – 93,85) (N=84)	66,66 (20,77 – 93,85) (N=84)	33,33 (6,15 – 79,23) (N=84)
TOTAL	63,63 (35,38 – 84,83) (N=356)	72,72 (43,44 – 90,25) (N=356)	18,18 (5,14 – 47,70) (N=356)

De acordo com o número de indivíduos positivos para *E. vermicularis* pelo resultado combinado das técnicas de Tubo, Kato-Katz e Paratest®, a sensibilidade do TF-Test® foi de 42,85% (IC a 95%: 15,82 – 74,95).

Ancilostomídeos (ANEXO VI)

A Tabela 4 mostra os valores de sensibilidade de cada uma das técnicas testadas para o diagnóstico de Ancilostomídeos.

Tabela 4. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de Ancilostomídeos em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz e Paratest®.

AMOSTRAS	TÉCNICAS		
	Tubo	Kato-Katz	Paratest®
	Sensibilidade (IC a 95%)		
1ª Amostra	100 (34,24 – 100) (N=160)	0 (0 – 65,76) (N=160)	50 (9,45 – 90,55) (N=160)
2ª Amostra	100 (20,65 – 100) (N=112)	0 (0 – 79,35) (N=112)	0 (0 – 79,35) (N=112)
TOTAL	100 (45,85 – 100) (N=356)	0 (0 – 56,15) (N=356)	33,33 (6,15 – 79,23) (N=356)

A técnica de TF-Test® não detectou nenhum caso de Ancilostomídeos.

Hymenolepis nana (ANEXO VII)

A Tabela 5 mostra os resultados de sensibilidade de cada uma das técnicas testadas para o diagnóstico de *H. nana*.

Tabela 5. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Hymenolepis nana* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz e Paratest®.

AMOSTRAS	TÉCNICAS		
	Tubo	Kato-Katz	Paratest®
	Sensibilidade (IC a 95%)		
1ª Amostra	100 (34,24 – 100) (N=160)	0 (0 – 65,76) (N=160)	50 (9,45 – 90,55) (N=160)
2ª Amostra	100 (20,65 – 100) (N=112)	0 (0 – 79,35) (N=112)	0 (0 – 79,35) (N=112)
TOTAL	100 (45,85 – 100) (N=356)	0 (0 – 56,15) (N=356)	33,33 (6,15 – 79,23) (N=356)

De acordo com o número de indivíduos positivos para *H. nana* pelo resultado combinado das técnicas de Tubo, Kato-Katz e Paratest®, a sensibilidade do TF-Test® foi de 50% (IC a 95%: 9,45 – 90,55).

Schistosoma mansoni (ANEXO VIII)

A Tabela 6 mostra os resultados de sensibilidade de cada uma das técnicas testadas para o diagnóstico de *S. mansoni*.

Tabela 6. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Schistosoma mansoni* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz e Paratest®.

AMOSTRAS	TÉCNICAS		
	Tubo	Kato-Katz	Paratest®
	Sensibilidade (IC a 95%)		
1ª Amostra	100 (20,65 - 100) (N=160)	100 (20,65 - 100) (N=160)	0 (0 - 79,35) (N=160)
2ª Amostra	33,33 (6,15 - 79,23) (N=112)	100 (43,85 - 100) (N=112)	0 (0 - 56,15) (N=112)
3ª Amostra	50 (9,45 - 90,55) (N=84)	100 (34,24 - 100) (N=84)	0 (0 - 65,76) (N=84)
TOTAL	50 (18,76 - 81,24) (N=356)	100 (60,97 - 100) (N=356)	0 (0 - 39,03) (N=356)

De acordo com o número de indivíduos positivos para *S. mansoni* pelo resultado combinado das técnicas de Tubo, Kato-Katz e Paratest®, a sensibilidade do TF-Test® foi de 25% (IC a 95%: 4,56 - 69,94).

O índice de concordância Kappa (k), calculado por amostra, entre as técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo e Kato-Katz foi de 0,663.

Strongyloides stercoralis (ANEXO IX)

Para *S. stercoralis* foram comparados os métodos de Sedimentação Espontânea em Tubo, Paratest® e Baermann-Moraes. A Tabela 7 mostra a sensibilidade de cada uma das técnicas testadas para o diagnóstico de *S. stercoralis*.

Tabela 7. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Paratest® e Baermann-Moraes.

AMOSTRAS	TÉCNICAS		
	Tubo	Paratest®	Baermann-Moraes
	Sensibilidade (IC a 95%)		
1ª Amostra	71,42 (35,89 – 91,78) (N=160)	28,57 (8,22 – 64,11) (N=160)	75 (30,06 – 95,44) (N=77)
2ª Amostra	80 (37,55 – 96,38) (N=112)	20 (3,62 – 62,45) (N=112)	33,33 (6,15 – 79,23) (N=30)
3ª Amostra	50 (15 – 85) (N=84)	50 (15 – 85) (N=84)	75 (30,06 – 95,44) (N=70)
TOTAL	68,75 (44,4 – 85,84) (N=356)	31,25 (14,16 – 55,60) (N=356)	63,63 (35,38 – 84,83) (N=177)

De acordo com o número de indivíduos positivos para *S. stercoralis* pelo resultado combinado das técnicas de Tubo, Paratest® e Baermann-Moraes, a sensibilidade do TF-Test® foi de 20% (IC a 95%: 5,67 – 50,98).

O índice de concordância Kappa (k), calculado por amostra, entre as técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo e Baermann-Moraes foi de 0,760.

Isospora belli (ANEXO X)

A Tabela 8 mostra os resultados de sensibilidade de cada uma das técnicas testadas para o diagnóstico de *I. belli*.

Tabela 8. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Isospora belli* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest®.

	TÉCNICAS	
	Tubo	Paratest®
AMOSTRAS	Sensibilidade (IC a 95%)	
1ª Amostra	100 (34,24 – 100) (N=160)	100 (34,24 - 100) (N=160)
2ª Amostra	100 (34,24 - 100) (N=112)	100 (34,24 - 100) (N=112)
3ª Amostra	100 (20,65 - 100) (N=84)	100 (20,65 - 100) (N=84)
TOTAL	100 (56,55 – 100) (N=356)	100 (56,55 – 100) (N=356)

De acordo com o número de indivíduos positivos para *I. belli* pelo resultado combinado das técnicas de Tubo e Paratest®, a sensibilidade do TF-Test® foi de 100% (IC a 95%: 43,85 – 100), sendo que essa metodologia detectou 1 caso a mais do que as técnicas de Tubo e Paratest®. Dessa forma, se a análise for realizada por indivíduo positivo para o protozoário, a sensibilidade do Tubo e do Paratest® é reduzida a 66,66% (IC a 95%: 20,77 – 93,85).

Giardia lamblia (ANEXO XI)

A Tabela 9 mostra os resultados de sensibilidade de cada uma das técnicas testadas para o diagnóstico de *G. lamblia*.

Tabela 9. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Giardia lamblia* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest®.

	TÉCNICAS	
	Tubo	Paratest®
AMOSTRAS	Sensibilidade (IC a 95%)	
1ª Amostra	68,75 (44,44 – 85,84) (N=160)	93,75 (71,67 – 98,89) (N=160)
2ª Amostra	66,66 (39,06 – 86,19) (N=112)	100 (75,75 – 100) (N=112)
3ª Amostra	57,14 (25,05 – 84,18) (N=84)	100 (64,57 – 100) (N=84)
TOTAL	65,71 (49,15 – 79,17) (N=356)	97,14 (85,47 – 99,49) (N=356)

De acordo com o número de indivíduos positivos para *G. lamblia* pelo resultado combinado das técnicas de Tubo e Paratest®, a sensibilidade do TF-Test® foi de 77,77% (IC a 95%: 54,79 – 91).

Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar (ANEXO XII)

Para o diagnóstico de amebas do complexo *E. histolytica/E. dispar* foram comparados métodos de sedimentação espontânea (Tubo e Paratest®), cultura de fezes frescas e cultura de sedimento de fezes. A Tabela 10 mostra os resultados de sensibilidade de cada uma das técnicas testadas para o diagnóstico dessas amebas.

Tabela 10. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Paratest®, Cultura de fezes frescas (Cultura F) e Cultura de sedimento de fezes (Cultura S).

	TÉCNICAS			
	Tubo	Paratest®	Cultura F	Cultura S
AMOSTRAS	Sensibilidade (IC a 95%)			
1ª Amostra	66,66 (20,77 – 93,85) (N=160)	33,33 (6,15 – 79,23) (N=159)	100 (43,85 – 100) (N=160)	33,33 (6,15 – 79,23) (N=156)
2ª Amostra	75 (30,06 – 95,44) (N=112)	50 (15 - 85) (N=111)	75 (30,06 – 95,44) (N=112)	25 (4,66 – 69,94) (N=109)
3ª Amostra	50 (9,45 – 90,55) (N=84)	50 (9,45 – 90,55) (N=84)	50 (9,45 – 90,55) (N=84)	50 (9,45 – 90,55) (N=83)
TOTAL	66,66 (35,42 – 87,94) (N=356)	44,44 (18,88 – 73,33) (N=354)	77,77 (45,26 – 93,68) (N=356)	33,33 (12,06 – 64,58) (N=348)

De acordo com o número de indivíduos positivos para o complexo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* pelo resultado combinado das técnicas do Tubo, Paratest®, cultura de fezes frescas e cultura de sedimento de fezes, a sensibilidade do método de TF-Test® foi de 50% (IC a 95%: 15 – 85).

Entamoeba coli (ANEXO XIII)

A Tabela 11 mostra os resultados das sensibilidades de cada uma das técnicas testadas para o diagnóstico de *E. coli*.

Tabela 11. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Entamoeba coli* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest®.

AMOSTRAS	TÉCNICAS	
	Tubo	Paratest®
	Sensibilidade (IC a 95%)	
1ª Amostra	100 (81,57 – 100) (N=160)	82,35 (58,97 – 93,81) (N=160)
2ª Amostra	93,33 (70,18 – 98,81) (N=112)	73,35 (48,05 – 89,10) (N=112)
3ª Amostra	100 (60,97 – 100) (N=84)	50 (18,76 – 81,24) (N=84)
TOTAL	97,36 (86,51 – 99,53) (N=356)	73,68 (57,99 – 85,03) (N=356)

De acordo com o número de indivíduos positivos para *E. coli* pelo resultado combinado das técnicas de Tubo e Paratest®, a sensibilidade do TF-Test® foi de 78,26% (IC a 95%: 58,10 – 90,34).

Endolimax nana (ANEXO XIV)

A Tabela 12 mostra os resultados das sensibilidades de cada uma das técnicas testadas para o diagnóstico de *E. nana*.

Tabela 12. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Endolimax nana* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest®.

	TÉCNICAS	
	Tubo	Paratest®
AMOSTRAS	Sensibilidade (IC a 95%)	
1ª Amostra	62,50 (42,71 – 78,84) (N=160)	79,16 (59,53 – 90,76) (N=160)
2ª Amostra	66,66 (41,71 – 84,82) (N=112)	93,33 (70,18 – 98,81) (N=112)
3ª Amostra	58,33 (31,95 – 80,67) (N=84)	83,33 (55,2 – 95,3) (N=84)
TOTAL	62,74 (49,03 – 74,68) (N=356)	84,31 (71,99 – 91,83) (N=356)

De acordo com o número de indivíduos positivos para *E. nana* pelo resultado combinado das técnicas de Tubo e Paratest®, a sensibilidade do TF-Test® foi de 56,25% (IC a 95%: 39,33 – 71,83).

Iodamoeba buschtlii (ANEXO XV)

A Tabela 13 mostra os resultados das sensibilidades de cada uma das técnicas testadas para o diagnóstico de *I. buschtlii*.

Tabela 13. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Iodamoeba buschtlii* em 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest®.

	TÉCNICAS	
	Tubo	Paratest®
AMOSTRAS	Sensibilidade (IC a 95%)	
1ª Amostra	100 (20,65 – 100) (N=160)	0 (0 – 79,35) (N=160)
2ª Amostra	100 (20,65 – 100) (N=112)	0 (0 – 79,35) (N=112)
TOTAL	100 (34,24 – 100) (N=356)	0 (0 – 65,76) (N=356)

A técnica de TF-Test® não detectou nenhum caso de *I. buschtlii*.

Blastocystis hominis (ANEXO XVI)

Para o diagnóstico de *B. hominis*, foram comparados métodos de Sedimentação Espontânea em Tubo, Paratest®, cultura de fezes frescas e cultura de sedimento de fezes. A Tabela 14 mostra os resultados de sensibilidade de cada uma das técnicas utilizadas para o diagnóstico de *B. hominis*.

Tabela 14. Valores de sensibilidade (IC a 95%) para o diagnóstico de *Blastocystis hominis* dentre as 356 amostras de fezes avaliadas pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Paratest®, Cultura de fezes frescas (Cultura F) e Cultura de sedimento de fezes (Cultura S).

	TÉCNICAS			
	Tubo	Paratest®	Cultura F	Cultura S
AMOSTRAS	Sensibilidade (IC a 95%)			
1ª Amostra	7,14 (3,09 – 15,66) (N=160)	31,88 (22,09 – 43,58) (N=159)	95,71 (88,14 – 98,53) (N=160)	53,03 (41,16 – 64,57) (N=156)
2ª Amostra	12,76 (5,98 – 25,17) (N=112)	43,47 (30,21 – 57,75) (N=111)	93,61 (82,84 – 97,81) (N=112)	45,45 (31,71 – 59,93) (N=109)
3ª Amostra	3,22 (0,57 – 16,19) (N=84)	64,51 (46,95 – 78,88) (N=84)	96,77 (83,81 – 99,43) (N=84)	53,33 (36,14 – 69,77) (N=83)
TOTAL	8,10 (4,7 – 13,64) (N=356)	42,46 (34,74 – 50,58) (N=354)	95,27 (90,56 – 97,69) (N=356)	50,71 (42,53 – 58,87) (N=348)

Não houve diferença estatística significativa dos casos diagnosticados entre as amostras para o mesmo teste. Entretanto, houve diferença estatística significativa ($p=0,00$) entre os testes para a mesma amostra. De acordo com o número de indivíduos positivos para *B. hominis* pelo resultado combinado das técnicas de Tubo, Paratest®, cultura de fezes frescas e cultura de sedimento de fezes, a sensibilidade do TF-Test® foi de 40,24% (IC a 95%: 30,3 – 51,06).

5.1.3.4. Análise da sensibilidade dos métodos de detecção de coproantígeno para diagnóstico de *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* e *Entamoeba histolytica*

O kit de detecção de coproantígeno para diagnóstico de *G. lamblia*, diagnosticou 22 casos, conforme o Quadro 1. De acordo com o número de indivíduos positivos pelo resultado combinado das técnicas de Tubo, Paratest® e TF-Test®, a sensibilidade do kit foi de 94,44% (IC a 95%: 74,24 – 99,01) e a especificidade 97,18% (IC a 95%: 92,98 – 98,90). Essa técnica detectou 4 casos não diagnosticados por nenhuma das técnicas de microscopia direta. Entretanto, o kit falhou em 1 caso detectado apenas pelo método do Tubo e Paratest®.

Já os kits de detecção de coproantígeno para *Cryptosporidium parvum* e *Entamoeba histolytica* diagnosticaram apenas 1 caso de cada protozoário, não detectados por nenhuma técnica de microscopia direta. A sensibilidade para ambos os kits foi de 100% (IC a 95%: 20,65 – 100).

5.1.3.5. Análise da sensibilidade do PCR específico para diagnóstico de *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* nas fezes

A técnica de PCR específica para diagnóstico de *E. histolytica* não detectou nenhum caso da ameba.

A PCR específica para *E. dispar* identificou que os 4 casos de amebas do complexo *E. histolytica/E. dispar* diagnosticados também pela microscopia direta, pertenciam à espécie não patogênica. Além desses casos, a PCR detectou um caso de *E. dispar* cujos cistos ou trofozoítos não foram visualizados por nenhuma outra técnica.

6. DISCUSSÃO

6.1. Análise crítica da amostra utilizada

O número de indivíduos arrolados no estudo (160), embora suficiente para avaliar a ocorrência dos diferentes parasitos, é insuficiente para comparação adequada dos métodos, devido à baixa prevalência observada. Por essa razão, a comparação feita se refere apenas à capacidade do método em identificar os diferentes parasitos. Apesar de não existirem dados sobre a prevalência de parasitos intestinais com amostras aleatórias na região metropolitana de Vitória, observações de resultados de laboratórios que realizam exames coproparasitológicos em amostras originadas dos diferentes logradouros da grande Vitória, como o Laboratório do HUCAM, mostram que a prevalência de *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *S. stercoralis*, *E. vermicularis*, *G. lamblia* e Ancilostomídeos oscila entre 4 e 25% (informação verbal¹). Considerando essa expectativa de prevalência a amostra tem força estatística de 80% para parasito com prevalência de 4%. Em relação a outros parasitos menos prevalentes no laboratório do HUCAM como *Taenia spp*, *Hymenolepis nana*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, *Isospora belli* e *Cryptosporidium parvum*, a amostra tem menor força estatística, já que esses parasitos têm baixa prevalência no nosso meio. Por esses motivos a interpretação de nossos resultados deve levar em consideração, para cada parasito, as falhas inerentes ao tamanho da amostra. Por outro lado, como comparamos técnicas realizadas em mais de uma amostra na maioria dos indivíduos, os cálculos para comparação foram muitas vezes realizados considerando o total de amostras (356) e não o total de indivíduos, o que melhora a força estatística dos resultados.

Já foi descrito que apenas uma amostra é insuficiente para diagnóstico de parasitos e conseqüentemente para comparação dos resultados das técnicas

¹ Dados informados pelo responsável técnico Cléber Vieira Rangel, do setor de Parasitologia do Laboratório de Patologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes.

(HIATT et al., 1995). No entanto, obter todas as amostras de fezes é um desafio para aqueles que trabalham com EPF. O fato de não termos tido as três amostras de todos os indivíduos é uma das dificuldades encontradas nos trabalhos realizados com amostras múltiplas de fezes, inclusive aqueles que comparam técnicas de EPF, como acontece, por exemplo, na investigação de *S. stercoralis* cujo diagnóstico em uma única amostra de fezes examinada propicia a detecção de apenas 30% das infecções que não apresentam complicações, enquanto que a sensibilidade do diagnóstico aumenta para 50% se forem utilizadas três amostras fecais, podendo chegar a 100% com a investigação de sete amostras (SUDRÉ et al., 2006).

6.2. Análise qualitativa das amostras utilizadas

A consistência da amostra está relacionada à execução e qualidade do resultado do EPF, podendo ser um dos fatores limitantes para a escolha da técnica. As amostras duras dificultam a execução de alguns métodos de EPF, como Kato-Katz e coproantígeno, pois a consistência ressecada atrapalha a passagem das fezes pela tela de nylon (primeira etapa de execução do Kato-Katz) e na homogeneização para a preparação de pequenas alíquotas destinadas à execução do coproantígeno. As amostras líquidas ou diarréicas são de difícil manejo quando utilizadas para execução de métodos como Kato-Katz (dificuldade de se manter uma alíquota estável sobre a lâmina além de alterar a contagem dos ovos) e Baermann-Moraes (a consistência líquida não permite a formação de uma pequena trouxa de amostra). No entanto, existem manobras úteis para minimizar estes problemas, como solidificação da amostra e ajuste da contagem de ovos, por exemplo, na técnica de Kato-Katz (quantitativa) (DE CARLI, 2007). Amostras liquefeitas devido a soluções de conservação necessitam de alguns artifícios para a sua análise pelo Kato-Katz. Um deles é utilizar a parte não preservada (ainda sólida da amostra) para execução da técnica (COSTA-MACEDO et al., 1999) e outro seria o acréscimo de amido para dar consistência pastosa à amostra. No entanto, o uso apenas

da parte sólida das fezes impede a homogeneização e o acréscimo do espessante pode alterar a relação número de ovos/grama de fezes.

A frequência de fezes diarréicas ou duras foi baixa (3,37 e 3,65% respectivamente), portanto não representaram problemas na execução e comparação dos diferentes métodos.

6.3. Avaliação dos métodos de Sedimentação Espontânea em Tubo, Kato-Katz, Paratest® e TF-Test® para identificação de helmintos e protozoários

Para a detecção de ovos de helmintos (*A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *E. vermicularis*, Ancilostomídeos, *H. nana* e *S. mansoni*) o método de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) foi o que demonstrou melhor sensibilidade. Os kits comerciais Paratest® e TF-Test®, embora tenham a vantagem de conservar a amostra em líquido de preservação (solução de formalina a 5%) e possibilitar a homogeneização do material sem manipulação direta, a sensibilidade dos mesmos foi muito baixa em relação ao RC. Além disso, o sedimento obtido com o Paratest® é de difícil observação já que proporciona um campo cheio de resíduos e artefatos, dificultando muitas vezes o achado e a identificação dos parasitos. O TF-Test® possui em sua etapa de concentração da amostra a utilização de solução de acetato de etila, um composto tóxico, irritante, inflamável e cuja manipulação constante deve ser evitada. Por outro lado, a Sedimentação Espontânea em Tubo por ser um método de fácil execução, baixo custo e boa sensibilidade, o que a indica como método de escolha para rotina no diagnóstico de helmintos.

Para a detecção de cistos e oocistos de protozoários (*I. belli*, *G. lamblia*, *E. histolytica/E. dispar*, *I. buschtlii*, *E. coli*, *E. nana* e *B. hominis*), o método do Paratest® foi a técnica que demonstrou melhor grau de sensibilidade. O fato do Paratest® utilizar solução de formalina tamponada a 5% possibilita a maior conservação das amostras e das formas de eliminação. Essa técnica também não possui nenhuma etapa de lavagem do sedimento, o que pode diminuir a perda de cistos e oocistos descartados com o sobrenadante. Entretanto, como

citado anteriormente, o sedimento proporcionado por essa metodologia é de difícil análise e o tempo demandado para a leitura das lâminas é superior às outras técnicas.

6.4. Avaliação dos métodos de Sedimentação Espontânea em Tubo, Kato-Katz, Paratest® e TF-Test® para identificação de *Schistosoma mansoni*

O nosso estudo comprovou a eficácia do Kato-Katz para o diagnóstico de *S. mansoni*, já que foi o único método capaz de detectar todas as amostras positivas para esse helminto. Dessa forma, confirmou-se que essa técnica é a mais eficiente para o diagnóstico de *S. mansoni* na rotina laboratorial de EPF, razão pela qual é recomendada pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1997) como o método mais adequado para diagnóstico desse trematóide. No entanto, sua sensibilidade para diagnóstico de outros helmintos foi mais baixa do que a Sedimentação Espontânea em Tubo.

6.5. Avaliação dos métodos de Sedimentação Espontânea em Tubo, Kato-Katz, Paratest®, TF-Test® e Baermann-Moraes para identificação de larvas de *Strongyloides stercoralis*

Para o diagnóstico de larvas de *S. stercoralis*, a técnica de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) demonstrou melhor sensibilidade, embora não significativa. Ao contrário da técnica de Baermann-Moraes, o Tubo independe da viabilidade das larvas, podendo ser executada com amostras colhidas mesmo após 24 horas de eliminação ou conservadas em líquidos conservantes (solução de formalina tamponada). Esse fato pôde ser comprovado devido ao número de amostras analisadas pelo Tubo (356) e a quantidade de amostras analisadas pelo Baermann-Moraes (177). As amostras entregues e colhidas no prazo superior a 24 horas, não foram analisadas pela técnica de Baermann-Moraes por acreditarmos que as larvas contidas nessas amostras já estariam mortas e inviáveis, o que causaria um impacto negativo na sensibilidade do método. A técnica de Kato-Katz também demonstrou baixa sensibilidade para o

diagnóstico de larvas de helmintos. A explicação para isso pode estar no fato que o Kato-Katz além de não concentrar a amostra, utiliza um corante (Verde Malaquita) que promove a diafanização e promove a digestão das larvas eliminadas, dificultando sua visualização.

6.6. Avaliação dos métodos de Sedimentação Espontânea em Tubo, cultura de fezes frescas, cultura de sedimento de fezes, Paratest® e TF-Test® para o diagnóstico de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* e *B. hominis*

Para o diagnóstico de *Entamoeba* do complexo *E. histolytica/E. dispar*, a técnica de cultura de fezes frescas foi a que obteve melhor sensibilidade com relação às outras técnicas de microscopia direta. A cultura de fezes proporciona a multiplicação das formas evolutivas (trofozoíto) desse protozoário, facilitando o diagnóstico dessas amebas. Entretanto, essa técnica não permite a diferenciação do complexo, necessitando de outros métodos capazes de realizar a distinção entre espécies patogênica e espécies comensais.

Já o diagnóstico de *B. hominis* foi superior pela técnica de cultura de fezes frescas. Esse protozoário elimina cistos nas fezes com tamanhos que variam de 6 a 40 µm, dificultando sua identificação por outras técnicas de microscopia direta. Além disso, a cultura de fezes frescas proporcionou a multiplicação e aumento das formas evolutivas, facilitando o diagnóstico desse protozoário.

Com relação à cultura de sedimento de fezes, os resultados obtidos não foram expressivos como os da cultura de fezes frescas, principalmente para o diagnóstico de *B. hominis*. Devido às lavagens sucessivas do sedimento, promovidas pela Sedimentação Espontânea em Tubo, acreditamos que formas evolutivas menos resistentes desse protozoário possam sofrer alteração pela água e conseqüentemente inibição de seu crescimento no meio de cultura Pavlova. Esses dados são fortalecidos pelo resultado do diagnóstico de *B.*

hominis pela sedimentação espontânea que também não obteve boa sensibilidade para detecção desse protozoário.

6.7. Avaliação dos kits comerciais para identificação de coproantígenos com os métodos de microscopia direta

Os kits de detecção de coproantígenos para diagnóstico de *G. lamblia*, *Cryptosporidium parvum* foram os de melhor sensibilidade para o diagnóstico desses protozoários, confirmando o que tem sido relatado na literatura sobre esses testes desde sua introdução. Os métodos de microscopia direta dependem de fatores como execução correta da técnica, microscópio adequado e de boa qualidade e principalmente microscopista treinado e capacitado para realizar o diagnóstico de diferentes parasitos e formas evolutivas. Em contra partida, os kits comerciais são de fácil execução e detectam pequenas quantidades de antígenos presentes nas fezes.

Em relação às amebas, a microscopia direta identificou quatro casos como sendo do complexo *E. histolytica/E. dispar*. Desses, nenhum foi confirmado pela pesquisa do coproantígeno. Isso indica que esses quatro casos eram de *E. dispar*, o que foi confirmado pelo PCR. Por outro lado, houve identificação de um caso de *E. histolytica* apenas pela pesquisa do coproantígeno, não detectado por nenhuma outra técnica, inclusive pelo PCR. É possível, portanto, que seja um resultado falso positivo do coproantígeno.

Vale ressaltar ainda que as técnicas de microscopia direta (Tubo, Paratest® e TF-Test®) não são preconizadas para diagnóstico de *C. parvum*. Essas técnicas requerem um microscopista treinado com capacidade para diagnosticar pequenas formas evolutivas, como é o caso dos oocistos de *C. parvum*, que medem cerca de 4-8 µm, sendo mais indicado o diagnóstico desta espécie por meio de coloração específica de Ziehl-Neelsen após concentração das fezes por técnicas de flutuação com sulfato de zinco (Faust). Utilizamos a metodologia de detecção de coproantígeno para *Cryptosporidium spp* objetivando fazer um levantamento da ocorrência desse protozoário.

6.8. O uso de PCR para diagnóstico e diferenciação de *Entamoeba* do complexo *histolytica/dispar*

As técnicas de PCR específicas tanto pra *E. histolytica* quanto para *E. dispar* realizadas a partir de DNA extraído das fezes, ao invés de culturas prévias, demonstrou ser promissora para a identificação e diferenciação desse complexo. A PCR consegue detectar pequenas quantidades de material genético presente nas fezes, o que aumenta muito a sensibilidade, além de diferenciar se a ameba em questão é patogênica ou comensal. Em nosso estudo, a PCR confirmou todos os caso da ameba visualizada na microscopia direta e detectou um caso não identificado por nenhuma outra técnica.

6.9. Análise crítica dos métodos em relação à sua execução e praticidade

6.9.1. Sedimentação Espontânea em Tubo

A técnica de sedimentação em Tubo demonstrou bom desempenho para diagnóstico de helmintos e protozoários parasitos e comensais. A possibilidade de trabalhar com tubos de polipropileno com tampa de rosca apresentou vantagens em relação ao uso dos tradicionais cálices de vidro, que incluem: maior segurança no laboratório, eliminação do odor e otimização do espaço de trabalho (RIBEIRO, 2011). Entretanto, a técnica requer maior tempo de trabalho disponível, já que sua metodologia compreende lavagens sucessivas do sedimento, seguida de ressuspensão que requer, pelo menos, uma hora de intervalo cada.

6.9.2. Baermann-Moraes

A técnica de Baermann-Moraes, considerada como técnica padrão ouro para diagnóstico de larvas de helmintos possui alguns fatores limitantes para sua execução, também observados no nosso estudo, entre os quais: o tempo entre

a coleta e a chegada da amostra ao laboratório (fator que depende exclusivamente do paciente), tempo entre o recebimento e a execução da técnica, forma de armazenamento da amostra e viabilidade das larvas – condições necessárias para o sucesso da técnica e que podem gerar um impacto negativo na sensibilidade do método.

Observamos que mesmo solicitando a entrega imediata após a coleta, muitas pessoas só encaminhavam as três amostras depois da terceira amostra ter sido coletada, fato constatado pela data registrada no frasco e pela observação macroscópica das fezes (que, as vezes, apresentavam fungos e sinais de ressecamento). Desta forma, o tempo entre a coleta da amostra e a execução da técnica foi indispensável para o sucesso dessa metodologia.

6.9.3. Kato-Katz

A técnica de Kato-Katz, considerada padrão ouro para diagnóstico de helmintos (WHO, 1997), comprovou o motivo de ser a metodologia preconizada pela OMS para diagnóstico de *S. mansoni* ao detectar 100% dos casos. Além de fácil execução, a técnica de Kato-Katz pode ser realizada em qualquer lugar, necessitando de poucos materiais e pequeno espaço, ideal para trabalhos de campo. No entanto, a sua sensibilidade foi baixa para identificação de nematóides. Isso ocorre quando a técnica é utilizada em regiões onde as infecções por helmintos são mais baixas ou quando há a análise apenas de uma única amostra (HIATT et al., 1995). Um pequeno número de ovos excretados no espécime e a análise de uma pequena amostra feita por essa metodologia (1/24 do grama de fezes que corresponde aproximadamente a 0,04 gramas de fezes) pode gerar um impacto negativo na sensibilidade do método. Vale ressaltar ainda que helmintos como o *S. stercoralis* eliminam larvas como forma evolutiva nas fezes, sendo assim um parasito negligenciado por essa metodologia (KNOPP et al., 2008).

6.9.4. Cultura de fezes frescas e cultura de sedimento de fezes

O cultivo de fezes frescas ou de sedimento em meio Pavlova modificado foi uma metodologia indispensável para o diagnóstico de *E. histolytica*/*E. dispar*, possibilitando um diagnóstico fácil e rápido de ser obtido. Além do diagnóstico de amebas, o cultivo proporcionou excelente diagnóstico também de *B. hominis*, demonstrando ser uma metodologia promissora para detecção e manutenção do protozoário em laboratório. Contudo, para execução dessa técnica, foram necessários equipamentos e materiais nem sempre disponíveis nos laboratórios de rotina de EPF, tais como capela de fluxo laminar, estufa bacteriológica, tubos próprios para meio de cultivo, material estéril e autoclavado e soro bovino esterilizado. A demanda desses materiais pode ser um fator limitante para implantação dessa metodologia nos laboratórios de análises clínicas.

6.9.5. Kits para diagnóstico de coproantígeno

Os kits para detecção de coproantígeno de *G. lamblia*, *E. histolytica* e *C. parvum* foram fundamentais para obtenção de um resultado final de diagnóstico desses parasitos, já que, em muitas vezes, apenas os kits detectaram casos que nenhuma outra metodologia foi capaz de diagnosticar. Contudo, os kits de coproantígeno possuem um alto custo e uma demanda laboral maior quando comparados com as outras metodologias.

6.9.6. PCR

A PCR é atualmente a técnica mais empregada quando se deseja obter resultados confiáveis e precisos, já que essa metodologia possui um alto grau de sensibilidade e especificidade em relação às outras metodologias. Devido a sua capacidade de amplificar partes específicas do material genético, essa técnica tem sido empregada para detecção de espécies patogênicas e não patogênicas de parasitos, como realizado nesse estudo para diferenciação de

espécies de amebas do complexo *E. histolytica/E. dispar*. Entretanto, para realização da PCR são necessários aparatos e reagentes caros, ainda restritos a poucos laboratórios de pesquisa.

Com base em estudos preliminares (informação verbal²), foi demonstrado que na extração realizada diretamente do sedimento fecal, apenas uma em cinco amostras sabidamente positivas, submetidas a extração por PVPP foi identificada pela reação para *E. dispar*. No entanto, se os cistos eram purificados por gradiente de sacarose antes da extração com PVPP, todas as amostras testadas, incluindo aquelas com pequena quantidade de cistos (<2500) foram amplificadas em uma das reações de PCR, permitindo a identificação específica.

Considerando estes dados, adotamos a purificação por sacarose, que havia demonstrado melhor eficiência da PCR, embora fosse uma etapa a mais no processamento das amostras. É provável que inibidores de PCR presentes nos sedimentos fecais sejam significativamente diminuídos, com a purificação prévia dos cistos. A bilirrubina e os sais biliares, presentes nas fezes são apontados como inibidores de PCR (WIDJOJOATMODJO et al., 1992). Outros inibidores são os compostos fenólicos, conhecidos pela capacidade de bloquear proteínas pela formação de pontes de hidrogênio com peptídeos. O ácido tânico, proveniente da digestão de vegetais por isso muito encontrado nas fezes, também é um composto fenólico e, portanto um inibidor de PCR. Além destes, existem ainda outras moléculas presentes nas fezes que ainda não foram identificadas e são capazes de inibir a amplificação de DNA (KREADER, 1996).

² Carolina Lumi Tanaka desenvolveu esta metodologia de purificação de cistos em projeto de Iniciação Científica na Universidade Federal do Paraná, 2008.

6.9.7. Paratest®

O Paratest® proporcionou um diagnóstico fácil e rápido, utilizando uma metodologia que consistia basicamente na conservação da amostra em solução de formalina a 5% tamponada, filtragem e concentração das formas evolutivas dos parasitos eliminados nas fezes. Entretanto, todo o procedimento foi realizado em laboratório e por pesquisadores esclarecidos de cada etapa da metodologia. Dessa forma, desconhecemos as dificuldades que possam existir no que diz respeito à coleta da amostra – etapa que é explicada em um folheto entregue ao paciente e realizada por cada indivíduo em seu domicílio. Para essa técnica, a quantidade de amostra colhida e colocada dentro do recipiente do Paratest® é fundamental para a qualidade do exame. Devido ao fato de o Paratest® não possuir em sua metodologia nenhum procedimento de lavagem do sedimento ou troca do líquido conservante, a visualização e leitura das lâminas foi um fator limitante para diagnóstico utilizando essa técnica. Em muitos casos, o sedimento formado era rico em pigmentos, amido e restos alimentares que dificultaram e demandaram tempo de leitura e diagnóstico superior às outras metodologias.

6.9.8. TF-Test®

O kit do TF-Test® não teve boa sensibilidade para o diagnóstico de parasitos intestinais, mas apresenta algumas vantagens que podem ser ainda melhoradas. Metodologia que utiliza três amostras de fezes concentrando-as em apenas um sedimento, o kit utiliza de reagentes como detergente e acetato de etila buscando uma maior qualidade de leitura das amostras ao eliminar gorduras, pigmentos e amido presentes em grande quantidade nas fezes. Entretanto, assim como o Paratest®, a coleta da amostra para execução do TF-Test® é feita pelo paciente, oferecendo os mesmos fatores interferentes que podem gerar um impacto negativo para a sensibilidade e qualidade do método. Além disso, o procedimento de concentrar três amostras em um sedimento pode causar um fator de diluição das amostras, já que muitos parasitos seguem um padrão de eliminação característico e intermitente. Caso

o indivíduo colete as três amostras em dias consecutivos, a probabilidade de pelo menos uma amostra ser negativa é grande, diminuindo a chance de um bom diagnóstico.

7. CONCLUSÃO

1. Para o diagnóstico de helmintos, não existe uma técnica padrão que seja 100% eficaz para a detecção de todas as espécies que possam aparecer na rotina laboratorial de EPF. Algumas espécies como *S. mansoni* e *S. stercoralis* necessitam de métodos específicos para que a sensibilidade do diagnóstico não seja prejudicada. Entre as técnicas testadas por esse estudo, a Sedimentação Espontânea em Tubo foi a que demonstrou melhor resultado.

2. Para o diagnóstico de protozoários parasitos, os kits de detecção de coproantígenos foram melhores para identificação de *G. lamblia*, *C. parvum* e *E. histolytica*. Entretanto, o kit para diagnóstico de *E. histolytica* não detecta a espécie *E. dispar*, somente realizada pela PCR. A cultura de fezes mostrou excelentes resultados para identificação de *Blastocystis hominis*.

3. Com relação aos kits comerciais (Paratest® e TF-Test®) disponíveis no Brasil, nossos resultados mostraram que, apesar de facilitarem a coleta da amostra e a sua conservação, têm menor sensibilidade do que a Sedimentação Espontânea em Tubo.

4. Em resumo, não existe nenhuma técnica capaz de diagnosticar todos os parasitos intestinais. Para cada parasito, há necessidade de uma técnica específica e de boa sensibilidade.

8. REFERÊNCIAS

- Arakaki T, Iwaanaga M, Kinjo F et al. Efficacy of Agar-plate culture in detection of *Strongyloides stercoralis* infection. *J Parasitol* 1990; 76:425.
- Blagg W, Schloegel EL, Mansour NS, Khalaf GI. A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. *Am J Trop Med Hyg.* 1955; 4(1):23-8.
- Blessmann J, Buss H, Nu PA, Dinh BT, Ngo QT, Van AL, Alla MD, Jackson TF, Ravdin JI, Tannich E. Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(12):4413-7.
- Carter MR, Gregorich EG. Soil sampling and methods of analysis. Second edition. Canadian Society of Soil Science, 2006.
- Chaves A, Alcantara OS, Carvalho OS, Santos JS. Estudo comparativo dos métodos coprológicos de Lutz, Kato-Katz e Faust modificado. *Rev Saúde Publ.* 1979; 13:348-352.
- Costa-Macedo LM, Costa M, Almeida LM. *Ascaris lumbricoides* in infants: a population-based study in Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saude Publica.* 1999; 15(1):173-8.
- Cringoli G, Rinaldi L, Maurelli MP, Utzinger J. FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nat Protoc.* 2010; 5(3):503-15.
- De Carli GA. Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2007.
- Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol.* 1993; 40(3):340-4.
- Faust EC, Sawitz W, Tobie J. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. *J. Parasitol.* 1939; .25:241-262.
- Faust EC, Ingalls JW, See JK. The Diagnosis of Schistosomiasis Japonica III. Technics for the Recovery of the Eggs of *Schistosoma japonicum*. *Am J Trop Med.* 1946; 26(5):559-584.
- Frei F, Juncansen C, Ribeiro-Paes JT. Epidemiological survey of intestinal parasite infections: analytical bias due to prophylactic treatment. *Cad Saude Publica.* 2008; 24(12):2919-25.
- Garfinkel LI, Giladi M, Huber M, Gitler C, Mirelman D, Revel M, Rozenblatt S. DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes. *Infect Immun.* 1989; 57(3):926-31.

- Glinz D, Silué KD, Knopp S, Lohourignon LK, Yao KP, Steinmann P, Rinaldi L, Cringoli G, N'Goran EK, Utzinger J. Comparing diagnostic accuracy of Kato-Katz, Koga agar plate, ether-concentration, and FLOTAC for *Schistosoma mansoni* and soil-transmitted helminths. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(7):754.
- Harada U, Mori AO. A new method for culturing hookworm. *Yonago Acta Med* 1955; 1:177-9.
- Hiatt RA, Markell EK, Ng E. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? *Am J Trop Med Hyg*. 1995; 53(1):36-9.
- Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. Sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. Puerto Rico. *J Publ Hlth*. 1934; 9: 283-298.
- Katagiri S, Oliveira-Sequeira TC. Comparison of three concentration methods for the recovery of canine intestinal parasites from stool samples. *Exp Parasitol*. 2010; 126(2):214-6.
- Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1972; 14(6):397-400.
- Knopp S, Mgeni AF, Khamis IS, Steinmann P, Stothard JR, Rollinson D, Marti H, Utzinger J. Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008; 2(11):331.
- Komiya Y, Kobayashi A. Evaluation of Kato's thick smear technique with a cellophane cover for helminth eggs in feces. *Jpn J Med Sci Biol*. 1966; 19: 59-64.
- Kreader CA. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl Environ Microbiol*. 1996; 62(3):1102-6.
- Lutz A. *Schistosomum mansoni* and schistosomiasis observed in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1919; 11:109-140.
- Montresor A, Crompton DWT, Hall A, Bundy DAP, Savioli L. Guidelines for the evaluation of soil-transmitted helminthiasis and schistosomiasis at community level. Geneva: World Health Organization; 1998. WHO document WHO/CDS/SIP/98.1 (available from the Programme Parasitic Diseases and Vector Control, World Health Organization, CH 1211 Geneva 27, Switzerland).
- Moraes RG. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidose no Brasil. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública*. 1948; 1:507-624.
- Neves DP. *Parasitologia Dinâmica*. 3ª Edição, São Paulo: Atheneu, 2009.
- Oliveira LM, Santos HL, Gonçalves MM, Barreto MG, Peralta JM. Evaluation of polymerase chain reaction as an additional tool for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010; 68(4):416-21.

- Ribeiro SR; Furst C. Parasitological stool sample exam by spontaneous sedimentation method using conical tubes: effectiveness, practice and biosafety. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011 (no prelo).
- Rivera WL, Tachibana H, Silva-Tahat MR, Uemura H, Kanbara H. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* DNA from cysts present in stool specimens by polymerase chain reaction: its field application in the Philippines. *Parasitol Res.* 1996; 82(7):585-9.
- Sapero JJ, Lawless DK. The MIF stain-preservation technic for the identification of intestinal protozoa. *Am J Trop Med Hyg.* 1953; 2(4):613-9.
- Steinmann P, Zhou XN, Du ZW, Jiang JY, Wang LB, Wang XZ, Li LH, Marti H, Utzinger J. Occurrence of *Strongyloides stercoralis* in Yunnan Province, China, and comparison of diagnostic methods. *PLoS Negl Trop Dis.* 2007; 31;1(1):75.
- Sudré AP, Macedo HW, Peralta RHS, Peralta JM. Diagnóstico da estrongiloidíase humana: importância e técnicas. *Ver patol trop.* 2006; 35(3), 173-184.
- Tachibana H, Kobayashi S, Takekoshi M, Ihara S. Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* 1991; 164(4):825-6.
- Tannich E, Horstmann RD, Knobloch J, Arnold HH. Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86(13):5118-22.
- ten Hove RJ, van Esbroeck M, Vervoort T, van den Ende J, van Lieshout L, Verweij JJ. Molecular diagnostics of intestinal parasites in returning travelers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009; 28(9):1045-53.
- Verweij JJ, Oostvogel F, Brienen EA, Nang-Beifubah A, Ziem J, Polderman AM. Short communication: Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in northern Ghana. *Trop Med Int Health.* 2003; 8(12):1153-6.
- Vianna EN, Costa JO, Santos CK, Cury MC, Silva EF, Costa AO, Gomes MA. An alternative method for DNA extraction and PCR identification of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in fecal samples. *Parasitology.* 2009; 136(7):765-9.
- Weitzel T, Dittrich S, Möhl I, Adusu E, Jelinek T. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 12(7):656-9.
- Widjoatmodjo MN, Fluit AC, Torensma R, Verdonk GP, Verhoef J. The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of salmonellae in fecal samples. *J Clin Microbiol.* 1992; 30(12):3195-9.
- Willis HH. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Med J Australia* 1921; 29:375-6.

World Health Organization. Amoebiasis. Weekly Epidemiological Record. 1997; 72: 97-99.

ANEXO I**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

TITULO: “Promoção de saúde em comunidades do Espírito Santo” e “Epidemiologia da *Entamoeba histolytica* e da *Entamoeba dispar* no estado do Espírito Santo e avaliação da patogenicidade dos isolados dessas amebas”

ENTIDADE EXECUTORA: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Coordenadora: Prof. ^a Dr. ^a Cinthia Furst Leroy Gomes – (27) 3335 7295

Você esta sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo melhorar as condições sanitárias do ambiente, diminuir a desnutrição e a ocorrência de parasitoses. Antes de aceitar participar da pesquisa, leia atentamente as explicações abaixo. Você poderá recusar a participar da pesquisa e poderá abandonar o projeto em qualquer momento, sem nenhuma penalização ou prejuízo.

Você coletará suas fezes com ou sem conservante para serem examinadas e terão os resultados destes exames. Se houver médico e disponibilidade de medicamento no município, os coordenadores do projeto entrarão em contato para que os doentes sejam tratados. Também será coletado 10 ml sangue por profissionais seguindo todas as normas de biossegurança com objetivo de realizar diagnóstico imunológico da amebíase e outras doenças parasitárias e exames complementares como hemograma e colesterol, se necessário. Serão realizadas medidas de peso e altura para avaliação nutricional. Serão realizadas entrevistas e aplicados questionários com objetivo de conhecer seus hábitos e o ambiente em que vive. Você poderá recusar a responder qualquer pergunta que lhe causar algum constrangimento. A sua participação ou a da pessoa sob sua responsabilidade não envolve nenhum risco para a sua saúde.

A sua participação como voluntário não lhe dará nenhum privilégio, seja ela de caráter financeiro ou de qualquer natureza. Serão garantidos o sigilo e privacidade, sendo reservado ao menor sob sua responsabilidade e/ou a você o direito de omissão de sua identificação ou de dados que possam comprometê-lo. Na apresentação dos resultados não será citado o seu nome.

Confirmando ter conhecimento do conteúdo deste termo. A minha assinatura abaixo indica que concordo em participar desta pesquisa e por isso dou meu consentimento. Também autorizo a participação do menor _____ sob minha responsabilidade. _____, _____ de _____ de _____.

Nome legível do responsável legal

Assinatura do responsável

Assinatura do pesquisador

ANEXO II

PAVLOVA (1938), modificado por SILVA (1972)

Reagente	Quantidade
Fosfato ácido de sódio (Na_2HPO_4) 7	3,9 g
H ₂ O	
Fosfato de Potássio (KH_2PO_4)	0,67 g
Cloreto de sódio (NaCl)	11,64 g
Extrato de levedo	2,33 g
Água destilada q.s.p.	1.600 ml

Após solubilização de todos os reagentes, ajusta-se o pH para 7,2/ 7,4 com NaOH 1N. À solução final, adiciona-se 5 % de soro bovino inativado a 56° C por 30 minutos, 1000 U/ml de penicilina G potássica, 500 µg/ml de estreptomicina. Para obtenção de um meio límpido e homogêneo, passa-se a solução pelo filtro "Seitz" para esterilização. À solução filtrada e em capela de fluxo laminar, acrescenta-se, em condições estéreis, 1 ml de amido (0,1g/l ou 1×10^{-4} g/ml solubilizado em meio Pavlova) de arroz triturado e estéril. O meio final é distribuído em alíquotas de 10 ml para tubos de rosca estéreis. Para realização de prova de esterilidade, 10% da dos tubos contendo meio são incubados a 37°C em estufa por 24 horas e a leitura é realizada, buscando a confirmação de que não houve contaminação durante o processo. Todos os outros tubos são armazenados em geladeira a 4°C.

ANEXO III

Tabela 15. Número de amostras positivas para *Ascaris lumbricoides* observados no exame parasitológico de 356 amostras de fezes, utilizando as técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz, Paratest®.

<i>Ascaris lumbricoides</i>				
Nº Registro	Tubo	Kato-Katz	Paratest®	RC
86.1	+	+	+	+
86.2	+	+	+	+
86.3	+	+	+	+
110	+	+	+	+
121	+	+	-	+
128.1	+	+	+	+
144.1	+	-	-	+
144.2	+	-	+	+
144.3	-	-	+	+
152	+	+	+	+
156	+	+	+	+
157	+	+	+	+
158	+	+	+	+
159	+	+	+	+
TOTAL	13	11	12	14

RC – Resultado combinado das técnicas

Tabela 16. Cálculos de sensibilidade para o diagnóstico de *Ascaris lumbricoides* pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz (KK) e Paratest® de acordo com a análise da 1ª, 2ª e 3ª amostras de fezes, considerando o resultado combinado (RC) das técnicas como padrão ouro.

<i>Ascaris lumbricoides</i>										
	1ª Amostra			2ª Amostra			3ª Amostra			Valor de p
	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	
Tubo +	10	0	10	2	0	2	1	0	1	0,07
Tubo -	0	150	150	0	110	110	1	82	83	
Total	10	150	160	2	110	112	2	82	84	
Sensibilidade	100%			100%			50%			
KK +	9	0	9	1	0	1	1	0	1	0,05
KK -	1	150	151	1	110	111	1	82	83	
Total	10	150	160	2	110	112	2	82	84	
Sensibilidade	90%			50%			50%			
Paratest® +	8	0	8	2	0	2	2	0	2	0,32
Paratest® -	2	150	152	0	110	110	0	82	82	
Total	10	150	160	2	110	112	2	82	84	
Sensibilidade	80%			100%			100%			
Valor de p	0,90			0,82			0,78			

ANEXO IV

Tabela 17. Número de amostras positivas para *Trichuris trichiura* observados no exame parasitológico de 356 amostras de fezes, utilizando as técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz (KK), Paratest®.

<i>Trichuris trichiura</i>				
Nº Registro	Tubo	Kato-Katz	Paratest®	RC
72.2	-	+	-	+
82.1	-	+	-	+
82.2	-	+	-	+
82.3	-	+	+	+
83.1	+	+	+	+
83.2	+	+	+	+
83.3	+	+	-	+
85.1	+	-	-	+
85.3	+	-	-	+
114	+	+	+	+
115	+	+	+	+
124.1	+	+	+	+
124.2	+	+	+	+
126.1	-	+	-	+
126.2	-	+	-	+
128.2	+	+	+	+
136	+	-	-	+
153	+	+	+	+
TOTAL	12	15	9	18

RC – Resultado combinado das técnicas

Tabela 18. Cálculos de sensibilidade para o diagnóstico de *Trichuris trichiura* pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz (KK) e Paratest® de acordo com a análise da 1ª, 2ª e 3ª amostras de fezes, considerando o resultado combinado (RC) das técnicas como padrão ouro.

<i>Trichuris trichiura</i>										
	1ª Amostra			2ª Amostra			3ª Amostra			Valor de p
	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	
Tubo +	7	0	7	3	0	3	2	0	2	0,65
Tubo -	2	151	153	3	106	109	1	81	82	
Total	9	151	160	6	106	112	3	81	84	
Sensibilidade	77,77%			50%			66,66%			
KK +	7	0	7	6	0	6	2	0	2	0,60
KK -	2	151	153	0	106	106	1	81	82	
Total	9	151	160	6	106	112	3	81	84	
Sensibilidade	77,77%			100%			66,66%			
Paratest® +	5	0	5	3	0	3	1	0	1	0,66
Paratest® -	4	151	155	3	106	109	2	81	83	
Total	9	151	160	6	106	112	3	81	84	
Sensibilidade	55,55%			50%			33,33%			
Valor de p	0,81			0,48			0,82			

ANEXO V

Tabela 19. Número de amostras positivas para *Enterobius vermicularis* observados no exame parasitológico de 356 amostras de fezes, utilizando as técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz (KK) e Paratest®.

<i>Enterobius vermicularis</i>				
Nº Registro	Tubo	Kato-Katz	Paratest®	RC
5.1	+	-	-	+
31.1	+	+	-	+
31.2	-	+	-	+
31.3	-	+	-	+
55.1	+	+	-	+
55.3	+	-	-	+
56.1	-	+	-	+
56.3	+	+	+	+
86.1	+	-	-	+
97	-	+	-	+
110	+	+	+	+
TOTAL	7	8	2	11

RC – Resultado combinado das técnicas

Tabela 20. Cálculos de sensibilidade para o diagnóstico de *Enterobius vermicularis* pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz (KK) e Paratest® de acordo com a análise da 1ª, 2ª e 3ª amostras de fezes, considerando o resultado combinado das técnicas como padrão ouro.

<i>Enterobius vermicularis</i>										
	1ª Amostra			2ª Amostra			3ª Amostra			Valor de p
	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	
Tubo +	5	0	5	0	0	0	2	0	2	0,18
Tubo -	2	153	155	1	111	112	1	81	82	
Total	7	153	160	1	111	112	3	81	84	
Sensibilidade	71,42%			0%			66,66%			
KK +	5	0	5	1	0	1	2	0	2	0,48
KK -	2	153	155	0	111	111	1	81	82	
Total	7	153	160	1	111	112	3	81	84	
Sensibilidade	71,42%			100%			66,66%			
Paratest® +	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0,54
Paratest® -	6	153	159	1	111	112	2	81	83	
Total	7	153	160	1	111	112	3	81	84	
Sensibilidade	14,28%			0%			33,33%			
Valor de p	0,23			0,37			0,82			

ANEXO VI

Tabela 21. Número de amostras positivas para Ancilostomídeos observados no exame parasitológico de 356 amostras de fezes, utilizando as técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz (KK) e Paratest®.

Ancilostomídeos				
Nº Registro	Tubo	Kato-Katz	Paratest®	RC
126.1	+	-	-	+
126.2	+	-	-	+
157	+	-	+	+
TOTAL	3	0	1	3

RC – Resultado combinado das técnicas

Tabela 22. Cálculos de sensibilidade para o diagnóstico de Ancilostomídeos pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz (KK) e Paratest® de acordo com a análise da 1ª, 2ª e 3ª amostras de fezes, considerando o resultado combinado das técnicas como padrão ouro.

Ancilostomídeos							Valor de p
	1ª Amostra			2ª Amostra			
		RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total
Tubo +	2	0	2	1	0	1	1,00
Tubo -	0	158	158	0	111	111	
Total	2	158	160	1	111	112	
Sensibilidade	100%			100%			
KK +	0	0	0	0	0	0	Na
KK -	2	158	160	1	111	112	
Total	2	158	160	1	111	112	
Sensibilidade	0%			0%			
Paratest® +	1	0	1	0	0	0	0,51
Paratest® -	1	158	159	1	111	112	
Total	2	158	160	1	111	112	
Sensibilidade	50%			0%			
Valor de p	0,37			0,37			

ANEXO VII

Tabela 23. Número de amostras positivas para *Hymenolepis nana* observados no exame parasitológico de 356 amostras de fezes, utilizando as técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz (KK) e Paratest®.

<i>Hymenolepis nana</i>				
Nº Registro	Tubo	Kato-Katz	Paratest®	RC
27.1	+	-	-	+
27.2	+	-	-	+
138	+	-	+	+
TOTAL	3	0	1	3

RC – Resultado combinado das técnicas

Tabela 24. Cálculos de sensibilidade para o diagnóstico de *Hymenolepis nana* pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz (KK) e Paratest® de acordo com a análise da 1ª, 2ª e 3ª amostras de fezes, considerando o resultado combinado das técnicas como padrão ouro.

<i>Hymenolepis nana</i>							Valor de p
	1ª Amostra			2ª Amostra			
	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	
Tubo +	2	0	2	1	0	1	1,00
Tubo -	0	158	158	0	111	111	
Total	2	158	160	1	111	112	
Sensibilidade	100%			100%			
KK +	0	0	0	0	0	0	Na
KK -	2	158	160	1	111	112	
Total	2	158	160	1	111	112	
Sensibilidade	0%			0%			
Paratest® +	1	0	1	0	0	0	0,51
Paratest® -	1	158	159	1	111	112	
Total	2	158	160	1	111	112	
Sensibilidade	50%			0%			
Valor de p	0,37			0,37			

ANEXO VIII

Tabela 25. Número de amostras positivas para *Schistosoma mansoni* observados no exame parasitológico de 356 amostras de fezes, utilizando as técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz (KK), Paratest®.

<i>Schistosoma mansoni</i>				
Nº Registro	Tubo	Kato-Katz	Paratest®	RC
22.1	+	+	-	+
22.3	+	+	-	+
30.2	-	+	-	+
30.3	-	+	-	+
91.2	-	+	-	+
101.2	+	+	-	+
TOTAL	3	6	0	6

RC – Resultado combinado das técnicas

Tabela 26. Cálculos de sensibilidade para o diagnóstico de *Schistosoma mansoni* pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Kato-Katz (KK) e Paratest® de acordo com a análise da 1ª, 2ª e 3ª amostras de fezes, considerando o resultado combinado (RC) das técnicas como padrão ouro.

<i>Schistosoma mansoni</i>										
	1ª Amostra			2ª Amostra			3ª Amostra			Valor de p
	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	
Tubo +	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0,89
Tubo -	0	159	159	2	109	11	1	82	83	
Total	1	159	160	3	109	112	2	82	84	
Sensibilidade	100%			33,33%			50%			
KK +	1	0	1	3	0	3	2	0	2	0,38
KK -	0	159	159	0	109	109	0	82	82	
Total	1	159	160	3	109	112	2	82	84	
Sensibilidade	100%			100%			100%			
Paratest® +	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Na
Paratest® -	1	159	159	3	109	112	2	82	84	
Total	1	159	160	3	109	112	2	82	84	
Sensibilidade	0%			0%			0%			
Valor de p	0,60			0,17			0,37			

ANEXO IX

Tabela 27. Número de amostras positivas para *Strongyloides stercoralis* observados no exame parasitológico de 356 amostras de fezes, utilizando as técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Baermann-Moraes (BM), Paratest®,

<i>Strongyloides stercoralis</i>				
Nº Registro	Tubo	BM	Paratest®	RC
4.1	-	-	+	+
4.2	-	-	+	+
4.3	-	-	+	+
19	-	+	-	+
21.1	+	NR	-	+
21.2	+	NR	-	+
21.3	+	+	+	+
22.1	+	NR	-	+
60.2	+	-	-	+
92	+	+	-	+
95.2	+	+	-	+
106.3	-	+	-	+
132.1	+	NR	-	+
132.2	+	NR	-	+
132.3	+	+	-	+
148	+	+	+	+
TOTAL	11	7	5	16

RC – Resultado combinado das técnicas

Tabela 28. Cálculos de sensibilidade para o diagnóstico de *Strongyloides stercoralis* pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Baermann-Moraes (BM) e Paratest® de acordo com a análise da 1ª, 2ª e 3ª amostras de fezes, considerando o resultado combinado (RC) das técnicas como padrão ouro.

<i>Strongyloides stercoralis</i>										
	1ª Amostra			2ª Amostra			3ª Amostra			Valor de p
	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	
Tubo +	5	0	5	4	0	4	2	0	2	0,89
Tubo -	2	153	155	1	107	108	2	80	82	
Total	7	153	160	5	107	112	4	80	84	
Sensibilidade	71,42%			80%			50%			
BM +	3	0	3	1	0	1	3	0	3	0,97
BM -	1	73	74	2	27	29	1	66	67	
Total	4	73	77	3	27	30	4	66	70	
Sensibilidade	75%			33,33%			75%			
Paratest® +	2	0	2	1	0	1	2	0	2	0,67
Paratest® -	5	153	158	4	107	108	2	80	82	
Total	7	153	160	5	107	112	4	80	84	
Sensibilidade	28,57%			20%			50%			
Valor de p	0,40			0,40			0,74			

ANEXO X

Tabela 29. Número de amostras positivas para *Isospora belli* observados no exame parasitológico de 356 amostras de fezes, utilizando as técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest®.

<i>Isospora belli</i>			
Nº Registro	Tubo	Paratest®	RC
46.1	+	+	+
46.2	+	+	+
84.1	+	+	+
84.2	+	+	+
84.3	+	+	+
TOTAL	5	5	5

RC – Resultado combinado das técnicas

Tabela 30. Cálculos de sensibilidade para o diagnóstico de *Isospora belli* pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest® de acordo com a análise da 1ª, 2ª e 3ª amostras de fezes, considerando o resultado combinado das técnicas como padrão ouro.

<i>Isospora belli</i>										
	1ª Amostra			2ª Amostra			3ª Amostra			Valor de p
	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	
Tubo +	2	0	2	2	0	2	1	0	1	0,91
Tubo -	0	158	158	0	110	110	0	83	83	
Total	2	158	160	2	110	112	1	83	84	
Sensibilidade	100%			100%			100%			
Paratest® +	2	0	2	2	0	2	1	0	1	0,91
Paratest® -	0	158	158	0	110	110	0	83	83	
Total	2	158	160	2	110	112	1	83	84	
Sensibilidade	100%			100%			100%			
Valor de p	1,00			1,00			1,00			

ANEXO XI

Tabela 31. Número de amostras positivas para *Giardia lamblia* observados no exame parasitológico de 356 amostras de fezes, utilizando as técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest®. RC- resultado combinado das técnicas.

<i>Giardia lamblia</i>			
Nº Registro	Tubo	Paratest®	RC
18.1	+	+	+
18.2	+	+	+
54	+	+	+
56.1	-	+	+
56.2	-	+	+
56.3	-	+	+
65.1	+	+	+
65.2	+	+	+
65.3	+	+	+
66.1	+	-	+
66.2	-	+	+
66.3	-	+	+
76.1	+	+	+
76.2	+	+	+
76.3	+	+	+
97	-	+	+
102	+	+	+
124.1	+	+	+
124.2	+	+	+
126.1	+	+	+
126.2	+	+	+
127.1	+	+	+
127.2	+	+	+
128.2	+	+	+
129.2	-	+	+
129.3	+	+	+
130.1	-	+	+
130.2	-	+	+
130.3	-	+	+
133	-	+	+
136	+	+	+
144.1	-	+	+
144.2	+	+	+
144.3	+	+	+
155	+	+	+
TOTAL	23	34	35

Tabela 32. Cálculos de sensibilidade para o diagnóstico de *Giardia lamblia* pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest® de acordo com a análise da 1ª, 2ª e 3ª amostras de fezes, considerando o resultado combinado (RC) das técnicas como padrão ouro.

<i>Giardia lamblia</i>										
	1ª Amostra			2ª Amostra			3ª Amostra			Valor de p
	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	
Tubo +	11	0	11	8	0	8	4	0	4	0,78
Tubo -	5	144	149	4	100	104	3	77	80	
Total	16	144	160	12	100	112	7	77	84	
Sensibilidade	68,75%			66,66%			57,14%			
Paratest® +	15	0	15	12	0	12	7	0	7	0,87
Paratest® -	1	144	145	0	100	100	0	77	77	
Total	16	144	160	12	100	112	7	77	84	
Sensibilidade	93,75%			100%			100%			
Valor de p	0,45			0,39			0,38			

ANEXO XII

Tabela 33. Número de amostras positivas para *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* observados no exame parasitológico de 356 amostras de fezes, utilizando as técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Paratest®, Cultura de fezes frescas (Cultura F) e Cultura de sedimento de fezes (Cultura S).

<i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i>					
N° Registro	Tubo	Paratest®	Cultura F	Cultura S	RC
47.2	-	-	-	+	+
47.3	-	-	+	+	+
89.1	+	+	+	+	+
89.2	+	+	+	-	+
89.3	+	+	-	-	+
142.1	+	-	+	-	+
142.2	+	-	+	-	+
143.1	-	-	+	-	+
143.2	+	+	+	-	+
TOTAL	6	4	7	3	9

RC – Resultado combinado das técnicas

Tabela 34. Cálculos de sensibilidade para o diagnóstico de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Paratest®, Cultura de fezes frescas (Cultura F) e Cultura de sedimento de fezes (Cultura S) de acordo com a análise da 1ª, 2ª e 3ª amostras de fezes, considerando o resultado combinado como padrão ouro

<i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i>										
	1ª Amostra			2ª Amostra			3ª Amostra			Valor de p
	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	
Tubo +	2	0	2	3	0	3	1	0	1	0,62
Tubo -	1	157	158	1	108	109	1	82	83	
Total	3	157	160	4	108	112	2	82	84	
Sensibilidade	66,66%			75%			50%			
Paratest® +	1	0	1	2	0	2	1	0	1	0,67
Paratest® -	2	157	159	2	108	110	1	82	83	
Total	3	157	160	4	108	112	2	82	84	
Sensibilidade	33,33%			50%			50%			
Cultura F +	3	0	3	3	0	3	1	0	1	0,76
Cultura F -	0	157	157	1	108	109	1	82	83	
Total	3	157	160	4	108	112	2	82	84	
Sensibilidade	100%			75%			50%			
Cultura S +	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0,89
Cultura S -	2	157	159	3	108	111	1	82	83	
Total	3	157	160	4	108	112	2	82	84	
Sensibilidade	33,33%			25%			50%			
Valor de p	0,67			0,75			1,00			

ANEXO XIII

Tabela 35. Número de amostras positivas para *Entamoeba coli* observados no exame parasitológico de 356 amostras de fezes, utilizando as técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest®.

<i>Entamoeba coli</i>			
Nº Registro	Tubo	Paratest®	RC
3.1	+	+	+
3.2	+	+	+
20.2	+	+	+
25.1	+	+	+
25.2	+	+	+
27.2	+	+	+
27.3	+	-	+
31.1	+	+	+
31.2	+	-	+
31.3	+	-	+
35.1	+	+	+
35.2	+	+	+
35.3	+	-	+
49.2	+	-	+
55.1	+	-	+
55.2	+	+	+
55.3	+	+	+
63.1	+	+	+
63.2	+	+	+
63.3	+	+	+
67.2	+	-	+
68.1	+	-	+
86.1	+	+	+
86.2	+	+	+
86.3	+	+	+
106.1	+	-	+
121	+	+	+
123.1	+	+	+
123.2	+	+	+
126.2	+	-	+
128.1	+	+	+
137	+	+	+
142.1	+	+	+
142.2	+	+	+

143.1	+	+	+
143.2	-	+	+
156	+	+	+
157	+	+	+
TOTAL	37	29	38

RC – Resultado combinado das técnicas

Tabela 36. Cálculos de sensibilidade para o diagnóstico de *Entamoeba coli* pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest® de acordo com a análise da 1ª, 2ª e 3ª amostras de fezes, considerando o resultado combinado das técnicas como padrão ouro.

<i>Entamoeba coli</i>										
	1ª Amostra			2ª Amostra			3ª Amostra			Valor de p
	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	
Tubo +	17	0	17	14	0	14	6	0	6	0,54
Tubo -	0	143	143	1	97	98	0	78	78	
Total	17	143	160	15	97	112	6	78	84	
Sensibilidade	100%			93,33%			100%			
Paratest® +	14	0	14	11	0	11	3	0	3	0,28
Paratest® -	3	143	146	4	97	101	3	78	81	
Total	17	143	160	15	97	112	6	78	84	
Sensibilidade	82,35%			73,35%			50%			
Valor de p	0,60			0,56			0,32			

ANEXO XIV

Tabela 37. Número de amostras positivas para *Endolimax nana* observados no exame parasitológico de 356 amostras de fezes, utilizando as técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest®.

<i>Endolimax nana</i>			
Nº Registro	Tubo	Paratest®	RC
2.1	-	+	+
2.2	-	+	+
3.1	+	+	+
3.2	+	+	+
5.1	+	-	+
5.2	+	-	+
9.1	-	+	+
9.2	+	+	+
9.3	+	-	+
17.1	+	+	+
17.2	+	+	+
27.2	+	+	+
27.3	+	+	+
28.1	-	+	+
35.1	+	-	+
35.2	+	+	+
35.3	+	+	+
39.2	-	+	+
41.2	-	+	+
41.3	+	+	+
53.3	+	+	+
55.3	-	+	+
56.1	-	+	+
56.3	-	+	+
60.2	+	+	+
60.3	-	+	+
63.3	-	+	+
76.1	+	+	+
76.2	+	+	+
76.3	+	+	+
85.1	-	+	+
85.2	-	+	+
85.3	-	+	+
86.1	+	+	+

86.3	+	-	+
98	-	+	+
99.1	+	-	+
108	+	-	+
120	+	+	+
127.1	+	+	+
127.2	+	+	+
128.1	+	-	+
142.1	-	+	+
142.2	-	+	+
143.1	+	+	+
143.2	+	+	+
144.1	-	+	+
150	+	+	+
151	+	+	+
152	+	+	+
154	-	+	+
TOTAL	32	43	51

RC – Resultado combinado das técnicas

Tabela 38. Cálculos de sensibilidade para o diagnóstico de *Endolimax nana* pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest® de acordo com a análise da 1ª, 2ª e 3ª amostras de fezes, considerando o resultado combinado das técnicas como padrão ouro.

	<i>Endolimax nana</i>									Valor de p
	1ª Amostra			2ª Amostra			3ª Amostra			
	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	
Tubo +	15	0	15	10	0	10	7	0	7	0,96
Tubo -	9	136	145	5	97	102	5	72	77	
Total	24	136	160	15	97	112	12	72	84	
Sensibilidade	62,50%			66,66%			58,33%			
Paratest® +	19	0	19	14	0	14	10	0	10	0,98
Paratest® -	5	136	141	1	97	98	2	72	74	
Total	24	136	160	15	97	112	12	72	84	
Sensibilidade	79,16%			93,33%			83,33%			
Valor de p	0,51			0,43			0,48			

ANEXO XV

Tabela 39. Número de amostras positivas para *Iodamoeba buschtlii* observados no exame parasitológico de 356 amostras de fezes, utilizando as técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest®.

<i>Iodamoeba buschtlii</i>			
Nº Registro	Tubo	Paratest®	RC
47.1	+	-	+
47.2	+	-	+
TOTAL	2	0	2

RC – Resultado combinado das técnicas

Tabela 40. Cálculos de sensibilidade para o diagnóstico de *Iodamoeba buschtlii* pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo) e Paratest® de acordo com a análise da 1ª, 2ª e 3ª amostras de fezes, considerando o resultado combinado das técnicas como padrão ouro.

<i>Iodamoeba buschtlii</i>							
	1ª Amostra			2ª Amostra			Valor de p
	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	
Tubo +	1	0		1	0	1	1,00
Tubo -	0	159	160	0	111	112	
Total	1	159	160	1	111	112	
Sensibilidade	100%			100%			
Paratest® +	0	0	0	0	0	0	1,00
Paratest® -	1	159	160	1	111	112	
Total	1	159	160	1	111	112	
Sensibilidade	0%			0%			
Valor de p	1,00			1,00			

ANEXO XVI

Tabela 41. Número de amostras positivas para *Blastocystis hominis* observados no exame parasitológico de 356 amostras de fezes, utilizando as técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Paratest®, Cultura de fezes frescas (Cultura F) e Cultura de sedimento de fezes (Cultura S).

<i>Blastocystis hominis</i>					
Nº de Registro	Tubo	Paratest®	Cultura F	Cultura S	RC
3.1	+	+	+	-	+
3.2	+	+	+	-	+
4.1	+	-	+	+	+
4.2	+	-	+	+	+
4.3	+	-	+	+	+
5.1	+	+	+	+	+
5.2	+	+	+	+	+
5.3	-	+	+	+	+
6.1	-	+	+	-	+
6.2	-	+	+	-	+
6.3	-	+	+	-	+
7.1	-	+	+	+	+
7.2	-	+	+	+	+
9.1	+	+	+	+	+
9.2	+	+	+	+	+
9.3	-	+	+	+	+
10.1	-	NR	+	-	+
10.2	-	NR	+	-	+
12	-	-	+	-	+
15.1	-	+	+	-	+
15.2	-	-	+	+	+
17.1	-	+	+	+	+
17.2	-	+	+	+	+
18.1	-	+	-	-	+
18.2	+	-	-	-	+
19	-	+	+	NR	+
20.1	-	-	+	NR	+
20.2	-	+	+	NR	+
21.1	-	+	+	NR	+
21.2	-	+	+	NR	+
21.3	-	+	+	NR	+
25.1	+	-	+	-	+
25.2	-	-	+	-	+
27.1	-	+	-	-	+
27.2	-	+	-	-	+
27.3	-	+	-	-	+
28.1	-	-	+	-	+
28.2	-	-	+	-	+
28.3	-	+	+	-	+
31.1	-	-	+	+	+

31.2	-	-	+	+	+
31.3	-	-	+	-	+
35.1	-	-	+	-	+
35.2	-	-	+	+	+
35.3	-	-	+	+	+
38.2	-	+	+	-	+
38.3	-	-	+	-	+
39.2	-	+	-	NR	+
40.1	-	-	+	+	+
40.2	-	-	+	+	+
40.2	-	-	+	-	+
41.1	-	-	+	+	+
41.2	-	-	+	+	+
41.3	-	+	+	+	+
42.1	-	-	+	NR	+
49.2	-	-	+	-	+
49.3	-	-	+	-	+
50.3	-	-	+	-	+
53.1	-	-	+	-	+
53.2	-	-	+	-	+
53.3	-	-	+	+	+
55.1	-	-	+	-	+
55.2	-	-	+	-	+
55.3	-	+	+	+	+
56.1	-	-	+	-	+
56.2	-	-	+	-	+
56.3	-	-	+	-	+
60.2	+	+	+	-	+
60.3	-	+	+	-	+
61.2	-	-	+	-	+
63.1	-	-	+	-	+
63.2	-	-	+	-	+
63.3	-	+	+	-	+
65.1	-	+	+	+	+
65.2	-	+	+	-	+
65.3	-	+	+	-	+
67.1	-	-	+	+	+
67.2	-	+	+	+	+
67.3	-	+	+	+	+
68.1	-	-	+	-	+
68.2	-	-	+	-	+
68.3	-	+	+	+	+
71	-	-	+	-	+
75.1	-	-	+	-	+
75.2	-	-	+	-	+
75.3	-	-	+	-	+
76.1	-	-	+	+	+
76.2	-	-	+	+	+
76.3	-	+	+	+	+
79.1	-	+	+	+	+
79.2	-	-	+	+	+
79.3	-	-	+	+	+

82.1	-	-	+	-	+
82.2	-	+	+	+	+
82.3	-	+	+	+	+
83.1	-	+	+	+	+
83.2	-	+	+	+	+
83.3	-	+	+	+	+
86.1	-	-	+	+	+
86.2	-	-	+	+	+
86.3	-	+	+	+	+
88.1	-	-	+	+	+
88.2	-	+	+	+	+
88.3	-	+	+	+	+
90	-	+	+	-	+
91.1	-	-	+	-	+
91.2	-	+	+	-	+
91.3	-	+	+	-	+
92	-	-	+	-	+
94.1	-	-	+	-	+
95.1	-	-	+	-	+
97	-	+	+	+	+
98	-	-	+	-	+
100.1	-	-	+	+	+
100.3	-	-	+	+	+
105.1	-	-	+	-	+
105.2	-	-	+	-	+
105.3	-	+	+	-	+
108	-	-	+	+	+
109	-	-	+	+	+
110	-	-	+	+	+
111	-	-	+	+	+
112	-	+	+	+	+
117.1	-	-	+	-	+
120	-	-	+	+	+
121	-	-	+	+	+
123.1	-	-	+	-	+
123.2	-	-	+	-	+
124.1	-	-	+	+	+
124.2	-	-	+	+	+
127.1	-	+	+	+	+
127.2	-	+	+	-	+
128.1	-	-	+	-	+
128.2	-	-	+	+	+
137	-	-	+	+	+
138	-	-	+	+	+
142.1	-	-	+	+	+
142.2	-	-	+	+	+
143.1	-	-	+	+	+
143.2	-	+	+	-	+
146	-	+	+	-	+
147	-	+	-	-	+
150	-	-	+	+	+
151	-	+	+	+	+

	152	-	-	+	+	+
	153	-	-	+	+	+
	154	-	+	+	-	+
	160	-	-	+	+	+
TOTAL		12	62	141	71	148

RC – Resultado combinado das técnicas

Tabela 42. Cálculos de sensibilidade para o diagnóstico de *Blastocystis hominis* pelas técnicas de Sedimentação Espontânea em Tubo (Tubo), Paratest®, Cultura de fezes frescas (Cultura F) e Cultura de sedimento de fezes (Cultura S) de acordo com a análise da 1ª, 2ª e 3ª amostras de fezes, considerando o resultado combinado das técnicas como padrão ouro.

<i>Blastocystis hominis</i>										
	1ª Amostra			2ª Amostra			3ª Amostra			Valor de p
	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	RC +	RC -	Total	
Tubo +	5	0	5	6	0	6	1	0	1	0,29
Tubo -	65	90	155	41	65	106	30	53	83	
Total	70	90	160	47	65	112	31	53	84	
Sensibilidade	7,14%			12,76%			3,22%			
Paratest® +	22	0	22	20	0	20	20	0	20	0,26
Paratest® -	47	90	137	26	65	91	11	53	64	
Total	69	90	159	46	65	111	31	53	84	
Sensibilidade	31,88%			43,47%			64,51%			
Cultura F +	67	0	68	44	0	44	30	0	30	0,82
Cultura F -	3	90	92	3	65	68	1	53	54	
Total	70	90	160	47	65	112	31	53	84	
Sensibilidade	95,71%			93,61%			96,77%			
Cultura S +	35	0	35	20	0	20	16	0	16	0,78
Cultura S -	31	90	121	24	65	89	14	53	67	
Total	66	90	156	44	65	109	30	53	83	
Sensibilidade	53,03%			45,45%			53,33%			
Valor de p	0,00			0,00			0,00			