

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Utilização do Método de Concentração em Formol-Acetato de Etila
na Quantificação de Ovos de Helmintos e Avaliação de sua
Aplicabilidade em Inquéritos Epidemiológicos**

Ana Julia Urias dos Santos Araujo

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientadora:

Prof^a Dr^a Hermínia Yohko Kanamura

SÃO PAULO
2000

Ana Julia Urias dos Santos Araujo

Utilização do Método de Concentração em Formol-Acetato de Etila na
Quantificação de Ovos de Helmintos e Avaliação de sua Aplicabilidade em
Inquéritos Epidemiológicos

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Prof^a D^a Hermínia Yohko Kanamura
Orientadora/Presidente

Prof. Dr. Luiz Cândido Souza Dias
1º Examinador

Prof^a D^a Solange Maria Gennari
2º Examinador

São Paulo, 14 de dezembro de 2000

“ ...

*Hoje me sinto mais forte
Mais feliz quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco eu sei
Eu nada sei*

...

*Penso que cumprir a vida
Seja simplesmente
Compreender a marcha
Ir tocando em frente*

*Como um velho boiadeiro
Levando a boiada
Eu vou tocando os dias
Pela longa estrada
Eu vou
Estrada sou*

...

*Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
De ser feliz”*

(Almir Sater/Renato Teixeira)

Muito obrigada
minha querida Mãe,
meu saudoso Pai
e meus afetuosos Irmãos,
pela base sólida!

DEDICO ESTE TRABALHO

Ao meu esposo SERGIO,
com quem aprendi o sentido de
COMPANHEIRISMO,

e a nossos filhos:

CAROLINA,
Com quem aprendi que
“o Papai do Céu só quer QUE A GENTE SEJA FELIZ”

e RODRIGO,
através de quem compreendi o sentido de FAMÍLIA.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Hermínia Yohko Kanamura, pela orientação deste trabalho, pelo exemplo de dedicação e profissionalismo e, principalmente, pela transmissão de valores e conceitos de vida que me estimularam a repensar a própria conduta, profissional e pessoal: qualquer obstáculo pode ser vencido, desde que se mantenha a serenidade.

Ao Prof. Mestre Sérgio de Moura Araújo, por ter me despertado o interesse na área de Parasitologia, pela confiança em mim depositada e pelo apoio e incentivo constantes na carreira profissional e, em especial, na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Cândido Souza Dias, pelos ensinamentos transmitidos e pela oportunidade oferecida de discutir e planejar as diferentes fases deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi e à Profª Drª Marisa Porta Miche Hirschfeld, pelas sugestões e críticas na ocasião do exame geral de qualificação.

Aos Professores do Departamento de Análises Clínicas, em especial, à Profª Drª Sumie Hoshino Shimizu, à Profª Drª Adelaide José Vaz e à Profª Drª Arlete Emily Curi, pelo incentivo e atenção dispensada.

Ao Sr. Jancarlo Ferreira Gomes, assessor científico da Immunoassay Industria e Comércio Ltda., pelos esclarecimentos em relação ao Sistema Coprotest® e pela negociação junto à empresa, que gentilmente cedeu os *kits* comerciais utilizados neste trabalho.

À Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo (SUCEN) – Regional Taubaté, na pessoa das pesquisadoras Gisela Rita de Alvarenga Monteiro Marques e Maria Lucia Sadel Condino, pela parceria firmada e, em especial, à Ligia Leandro Nunes Serpa, pela organização das atividades de campo e laboratoriais, possibilitando o

estudo em amostras colhidas junto à população do município de Bananal, SP.

À Cleusa Moreira Santos, auxiliar do laboratório de Parasitologia da Universidade de Taubaté (UNITAU) e às estagiárias Katjy V. R. Martins Costa e Fabiana M. Feitosa, pela amizade e pelo auxílio no processamento de amostras.

Ao Prof. Dr. Gilio Giacomozi, do Grupo de Estudos em Língua Portuguesa da UNITAU, pela correção do texto e pelas sugestões.

Ao Prof. Dr. Jefferson Firmino das Chagas, do laboratório geral de Química da UNITAU, pelas instruções e apoio no preparo de solventes e soluções utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Mestre Claudemir Stellati, da área de Física da UNITAU, pelas sugestões e auxílio na definição das diferentes malhas empregadas nas técnicas laboratoriais.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Chaves, da área de Bioestatística da UNITAU, pela valiosa contribuição no tratamento matemático dos dados.

À Prof^ª Dr^ª Simey Thury Viera Fisch, da disciplina de Metodologia Científica do Departamento de Biologia da UNITAU, pelas sugestões e, principalmente, pela constante demonstração de coleguismo.

À Prof^ª Angela Maria Scachetti Mattos Pinto, Chefe do Departamento de Biologia da UNITAU, pelo apoio e compreensão, permitindo que dedicasse grande parte do meu tempo à realização deste trabalho.

À Prof^ª Mestre Sonia Maria Cursino dos Santos, da disciplina de Parasitologia da UNITAU, pela compreensão;

À “Dona Noca”, que me acolhendo em seu lar, ofereceu-me condições de trabalho: um ambiente tranquilo, propício ao estudo e reflexão.

Às amigas Rita Maria da Silva, Edite Kanashiro e Marylene de Brito Arduino, pelo apoio e incentivo constantes.

Aos colegas do curso de pós-graduação, em especial, à Eliana Timóteo Garcia, à Tania Sueli Andrade, ao Edward José de Oliveira e ao Luiz Carlos P. Valli, pelo companheirismo e troca de experiências.

Aos funcionários do Departamento de Análises Clínicas, em especial, à Marcia Cristina Caramico, secretária da pós-graduação e à Sonia Regina Caramico Buratto, técnica do laboratório de Parasitologia e Micologia, pela presteza, dedicação e amizade, que propiciaram um ambiente de trabalho muito agradável.

Ao pessoal do Serviço de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Benedita E. S. Oliveira, Elaine Midori Ychico e Jorge Alves de Lima, pela paciência e prontidão no atendimento aos acadêmicos aflitos!

À Silvia Cristina Monteiro, atendente do laboratório de Parasitologia da UNITAU, pela sua dedicação, e às minhas estagiárias Beatriz R. Alves, Cristiane P. Pereira, Elaine Aparecida Siqueira, Francine A. Silva, Karla N. L. Braga, Priscila Magalhães e Vanessa Grazielle de Oliveira, que compreenderam a importância deste momento.

À Universidade de Taubaté, pela bolsa de estudos concedida e por possibilitar e incentivar o aprimoramento profissional.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar este trabalho de Mestrado.

RESUMO

O método de diagnóstico coproparasitológico de concentração em formol-acetato de etila foi empregado para a quantificação de ovos de helmintos. O método quantitativo proposto foi padronizado utilizando-se o Sistema Comercial *Coprotest*[®] e amostras fecais contendo diferentes cargas de ovos de *Ascaris lumbricoides*. O “Coprotest quantitativo” foi aplicado em estudo populacional numa área de baixa endemicidade para parasitas diagnosticáveis através das fezes, e os resultados analisados comparativamente ao método de Kato-Katz. A metodologia proposta foi ainda comparada a outros métodos quantitativos, utilizando-se amostras fecais, preparadas em laboratório, com cargas decrescentes de ovos de *A. lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *Schistosoma mansoni*. Discutem-se as vantagens de se empregar um método capaz de detectar o maior número de espécies, tanto de helmintos quanto de protozoários, e que permita, concomitantemente, estimar a intensidade das infecções por geohelmintos e *S. mansoni* nas populações. O “Coprotest quantitativo” mostrou ser de aplicação viável em trabalhos de campo, fornecendo resultados comparáveis aos outros métodos quantitativos já descritos na literatura.

SUMÁRIO

1. Introdução	01
1.1. Objetivos	05
2. Material e Métodos	06
2.1. Padronização da metodologia de quantificação de ovos	06
2.2. Aplicação do <i>Coprotest quantitativo</i> em estudo populacional	09
2.3. Comparação do <i>Coprotest quantitativo</i> com outros métodos de quantificação	10
2.4. Análise Estatística	14
3. Resultados	15
4. Discussão	31
5. Conclusão	40
6. Referências Bibliográficas	42
Apêndices	49
Anexo	57

1. Introdução

A maioria dos helmintos que parasitam o homem podem ser diagnosticados pelo encontro de seus ovos ou larvas nas fezes de pessoas infectadas. As técnicas utilizadas para a detecção desses elementos parasitários estão baseadas no exame direto, diluição ou concentração da matéria fecal. Do ponto de vista prático, fatores como volume do material examinado, número de ovos produzidos pelo parasita e carga parasitária podem influenciar no diagnóstico. Já se observou que o número de ovos nas fezes do paciente pode variar significativamente de um dia para outro e também nas diferentes porções de um mesmo bolo fecal. Essa variação estaria relacionada à espécie do parasita e sua localização ao longo do tubo digestivo, à quantidade e tipo de alimento ingerido pelo hospedeiro e ao movimento peristáltico, que promove mistura não uniforme dos ovos com as fezes. Dentre os enteroparasitas, *Ascaris lumbricoides* é o mais fácil de se detectar, visto que o número de ovos produzido pelas fêmeas diariamente é muito elevado se comparado com outras espécies. Entretanto, flutuação diária na postura de ovos foi observada tanto para essa espécie quanto para outros Nematoda, como *Trichuris trichiura* e *Ancylostomatidae*, mas é para o Trematoda *Schistosoma mansoni* que se encontra maior número de trabalhos procurando mostrar essa variação pois, além dos fatores já citados, a presença de ovos nas fezes é dependente da passagem pela parede intestinal (Martin & Beaver, 1968; Hall, 1981; Hall, 1982).

Embora existam essas interferências, é reconhecida a importância da quantificação de ovos nas fezes. Do ponto de vista clínico, a determinação da carga parasitária pode auxiliar no acompanhamento e controle de cura de pacientes, além de ser útil na avaliação de drogas anti-helmínticas. Por outro lado, do ponto de vista epidemiológico, a estimativa da intensidade das infecções parasitárias possibilita avaliar a probabilidade de transmissão entre membros de uma mesma família ou entre indivíduos de uma mesma

comunidade (Hall, 1982) ou mesmo, o impacto das ações de controle e sobre as condições sanitárias a que estão submetidas as populações (Mascie-Taylor e cols., 1999).

Diversos pesquisadores propuseram métodos com a finalidade de quantificar ovos de helmintos; nesse sentido, Stoll (1923) desenvolveu uma técnica baseada na diluição das fezes, em especial para os estudos sobre ancilostomose (Stoll & Hausheer, 1926) e, visando ao controle da esquistossomose, Kato (1960) introduziu a técnica de esfregaço espesso; Bell (1963) propôs a técnica de concentração em papel de filtro e Barbosa (1965), a técnica de concentração por sedimentação espontânea. Katz e cols. (1972) realizaram uma modificação no método de Kato, facilitando sua aplicação, principalmente em estudos populacionais (Sleigh e cols., 1982; Costa e cols., 1985).

Muitos estudos foram realizados com o objetivo de avaliar e comparar esses métodos quantitativos e verificar sua eficiência no monitoramento de programas de controle, principalmente da esquistossomose (Scott, 1937; Cheever & Powers, 1968; Katz & Chaia, 1968; Chaia e cols., 1968; Martin & Beaver, 1968; Katz e cols., 1970; Cook e cols., 1974; Knight e cols., 1976; Cline e cols., 1977; Hiatt & Gebre-Medhin, 1977; Domingues e cols., 1980; Mott & Cline, 1980; Chieffi e col., 1981; Sleight e cols., 1982; Costa e cols., 1985; Barreto e cols., 1990; Engels e cols., 1996). Em áreas de baixa endemicidade para essa parasitose, onde se verifica número reduzido de pessoas infectadas e estas por sua vez apresentam baixa carga parasitária, é grande a possibilidade de falseamento do resultado, com conseqüente determinação subestimada da prevalência; para melhorar a eficiência diagnóstica do exame parasitológico de fezes, alguns autores sugerem a preparação de múltiplas lâminas de Kato-Katz (Cline e cols., 1977; Barreto e cols., 1990; De Vlas e cols., 1992), o que nem sempre é factível nos amplos inquéritos populacionais (De Vlas & Gryssels, 1992).

Os estudos epidemiológicos sobre helmintos intestinais geralmente são voltados à determinação do número de indivíduos acometidos, empregando-se para tal métodos de diagnóstico qualitativos, como o de sedimentação espontânea, desenvolvido por Lutz e descrito por Hoffman e cols. (1934) e o de concentração em formol-éter (Ritchie, 1948) ou em formol-acetato de etila (Young e cols., 1979). São poucos os trabalhos relacionados à estimativa da carga parasitária da comunidade, embora essa informação seja importante para se avaliar o saneamento ambiental (Hall e cols., 1992; Camillo-Coura, 1999). Em condições ideais de laboratório, qualquer técnica quantitativa poderia ser adotada para esses estudos, mas considerando a facilidade de execução, baixo custo e boa sensibilidade, o método de Kato-Katz tem sido o mais empregado, mostrando-se bastante útil na contagem de ovos dos geohelmintos (Hall, 1982; Dias e cols., 1992; Mascie-Taylor e cols. 1999).

Mesmo em áreas de baixa transmissão é comum o encontro de pessoas portando mais de uma espécie de parasita, muitas vezes com formas evolutivas que exigiriam o emprego de diferentes técnicas para sua detecção. Knight e cols. (1976) introduziram modificações no método de concentração em formol-éter (Ritchie, 1948), propondo seu emprego para diagnóstico genérico de enteroparasitas concomitante à quantificação de ovos de *S. mansoni*. Ao comparar a técnica de Ritchie modificada com o método de Kato-Katz, os mesmos autores observaram maior sensibilidade do primeiro na detecção de *S. mansoni*, especialmente em amostras com baixa carga de ovos. Outros autores utilizaram o método de Kato-Katz associado ao método de concentração em formol-acetato de etila, o que permitiu avaliar a intensidade da infecção por geohelmintos, através da técnica quantitativa, e estimar a prevalência da estrogiloidíase e das protozooses intestinais, através da técnica qualitativa (Albanico e cols., 1996). O emprego dessa metodologia certamente possibilita o levantamento

mais apurado das parasitoses detectáveis através das fezes, entretanto essa prática poderia inviabilizar os amplos estudos de campo.

Atualmente, vários laboratórios de Saúde Pública de hospitais públicos e também privados estão utilizando o Sistema *Coprotest*®, um *kit* comercial que permite a coleta de volume padronizado de fezes pelo próprio paciente. Após coleta, o material é imediatamente imerso em formalina tamponada, para posterior processamento em acetato de etila, e concentração dos elementos parasitários através da centrifugação (Cerqueira, 1988). Alguns autores compararam os resultados obtidos através desse sistema com os de outros métodos qualitativos, utilizados em rotina laboratorial, e encontraram boa concordância (Mello e cols., 1989; Amato Neto e cols., 1989; Mangini e cols., 1999). O processamento da amostra através desse sistema está baseado numa metodologia de reconhecida eficiência para o diagnóstico de helmintos e protozoários nas fezes, o método de Ritchie e cols. (1948) modificado por Young e cols. (1979). O *kit* vem provido de um dispositivo que permite a coleta de volume padronizado de fezes, cerca de um centímetro cúbico, o que possibilita sua utilização no diagnóstico quantitativo de ovos nas fezes. Assim, a proposta do presente estudo foi padronizar uma metodologia que permitisse a quantificação de ovos de helmintos através do sistema *Coprotest*® e avaliar a sua aplicabilidade em estudos epidemiológicos, em áreas de baixa endemicidade para *S. mansoni* e enteroparasitas.

1.1. Objetivos

- Estabelecer uma metodologia de quantificação de ovos de helmintos através do sistema comercial *Coprotest*®.
- Comparar os resultados qualitativos e quantitativos do *Coprotest*® com os obtidos no exame de duas lâminas de Kato-Katz, em amostras de fezes coletadas no campo.
- Comparar a metodologia de quantificação padronizada, a que se denominou no trabalho como “*Coprotest* quantitativo”, com os métodos de Kato-Katz, Stoll & Hausheer e Ritchie modificado.

2. Material e Métodos

2.1. Padronização da metodologia de quantificação através do sistema *Coprotest*[®]

2.1.1. Determinação do peso das amostras

O coletor do *kit Coprotest*[®] (NL Comércio Exterior Ltda.) comporta um volume de aproximadamente 1 centímetro cúbico de fezes (Figura 1). Para se estimar o peso do volume fecal examinado, 200 amostras de diferentes indivíduos foram pesadas em balança eletrônica de duas casas decimais. Essas amostras, de diversas consistências, foram obtidas no trabalho de campo descrito adiante (item 2.2). O peso da amostra fecal foi dado pela diferença entre o obtido do coletor antes e após a colocação do material fecal.

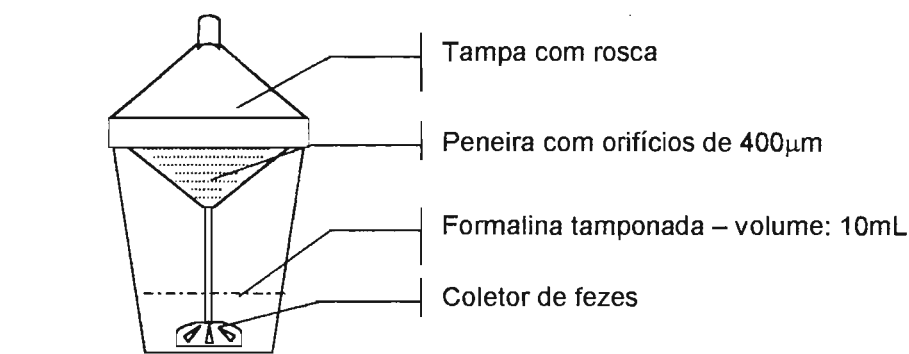


Figura 1: Esquema do *kit Coprotest*[®]

2.1.2. Processamento de amostras positivas para *Ascaris lumbricoides*

Foram selecionadas, através do método de Lutz (Hoffman e cols., 1946), quatro amostras fecais com número variado de ovos, preparando-se

dois kits *Coprotest*® para cada uma delas. As fezes foram colocadas no coletor próprio do *kit* e introduzidas no conservante, constituído de 10mL de solução a 10% de formalina tamponada. O processamento das amostras foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Anexo 1), com algumas adaptações, conforme esquema abaixo (Figura 2).

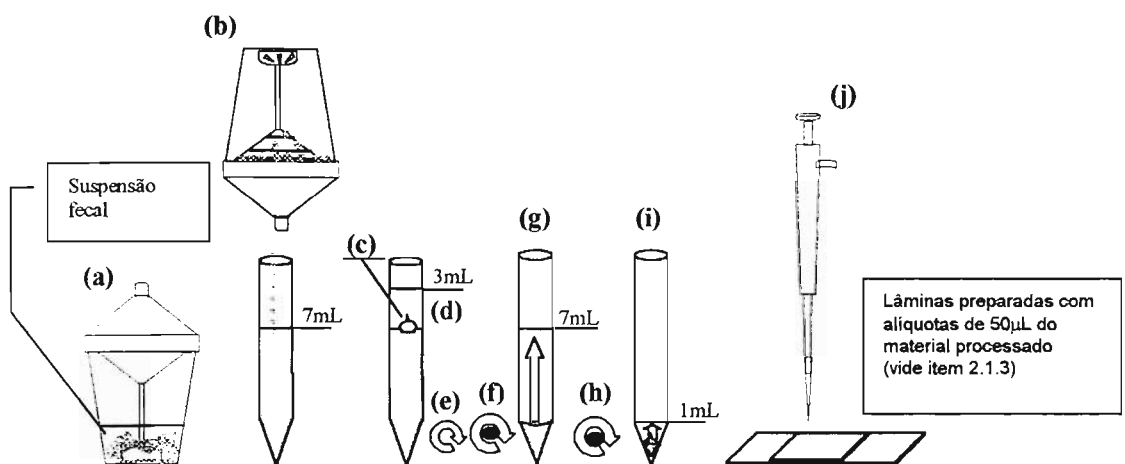


Figura 2: Esquema do processamento das fezes através do Sistema Coprotest®

- (a) homogeneização do material fecal, que neste estudo foi realizada com o auxílio de agitador de tubo, por 20 segundos;
- (b) transferência de 7mL da suspensão obtida para um tubo de centrífuga de 10mL;
- (c) adição de 1 gota de detergente doméstico;
- (d) adição de 3mL de acetato de etila comercial;
- (e) homogeneização através de agitação manual vigorosa;
- (f) centrifugação durante 2 minutos a 1500 rpm;
- (g) descarte do sobrenadante e ressuspensão do sedimento a 7mL, com água destilada;
- (h) nova centrifugação por 2 minutos a 1500 rpm e descarte do sobrenadante;
- (i) ressuspensão do sedimento a 1mL, com água destilada (procedimento adotado para ajustar o volume da suspensão fecal das diferentes amostras e possibilitar a padronização da metodologia de quantificação: vide item 3.1.1);
- (j) Preparo de lâminas para observação ao microscópio.

2.1.3. Quantificação dos ovos por rastreamento completo da lâmina

Para cada *kit* processado foram preparadas duas lâminas após homogeneização do sedimento ressuspenso em água destilada. Em cada lâmina foi colocada uma alíquota de exatamente 50 μ L e adicionada essa mesma quantidade de água destilada, de forma a permitir que o material ficasse uniformemente espalhado sob a lamínula de vidro de 24x32mm. A leitura foi realizada em microscópio de luz com aumento de 100x e todos os ovos encontrados nas lâminas foram contados.

2.1.4. Quantificação por amostragem

Procurando-se facilitar a contagem nas amostras que continham elevado número de ovos, estabeleceu-se uma metodologia de amostragem. Para tanto, utilizando-se a ferramenta desenho do *Microsoft Word*, elaborou-se em transparência um gabarito retangular, com 24x40mm, em cujo centro geométrico traçou-se uma área circular com 22mm de diâmetro; inseridos nessa área circular foram traçados 10 círculos (campos) de diâmetro correspondente ao visualizado através da objetiva de 10x do microscópio óptico marca Olympus. Esse gabarito, colocado sobre a lamínula de vidro (Figura 3), após o rastreamento completo da lâmina conforme item 2.1.3, permitiu a contagem dos ovos contidos em dez diferentes campos da lâmina. O número total de ovos na alíquota examinada foi determinado pela média aritmética do número de ovos dos dez campos, multiplicada por 221, que corresponde ao número de campos da lamínula de vidro de 24x32mm. Os resultados obtidos na quantificação por amostragem foram comparados com os obtidos no rastreamento completo da lâmina.

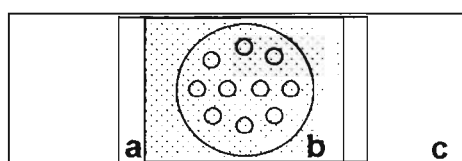


Figura 3: Esquema do gabarito (a) sobre a lamínula (b) em lâmina (c) preparada para contagem de ovos por amostragem.

2.2. Aplicação do “Coprotest quantitativo” em estudo populacional

Para a realização dessa fase, foram utilizadas amostras fecais provenientes da população total residente no Bairro do Centro do Município de Bananal - SP, colhidas no período de maio a junho de 1998, contando-se com a estrutura de campo e laboratorial da Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN - Regional Taubaté. Foram distribuídas 2000 latas coletoras, das quais 913 retornaram com fezes e foram submetidas ao processamento pelo método de Kato-Katz (Katz e cols, 1972), com a preparação de duas lâminas por amostra (Figura 4).

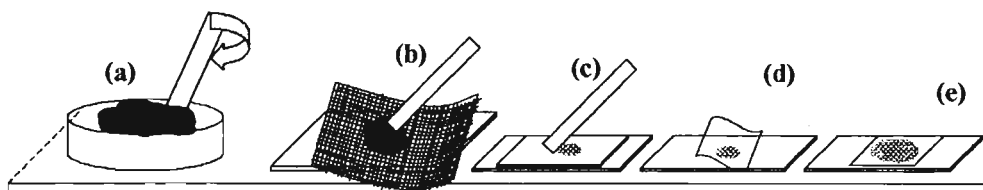


Figura 4: Esquema do processamento de amostras pelo método de Kato-Katz

- (a) Frasco contendo fezes: homogeneização do material fecal;
- (b) Transferência de uma porção de fezes para uma folha de papel e tamisação em tela de 105 malhas por polegada quadrada, recolhendo o material tamisado com uma espátula limpa;
- (c) Transferência das fezes tamisadas para um cartão perfurado disposto sobre uma lâmina de vidro, preenchendo todo o espaço (volume fecal correspondente a cerca de 0,045g);
- (d) Retirada do cartão e encobrimento da alíquota de fezes com uma lamínula de celofane previamente embebida em solução glicerínica de verde malaquita;
- (e) Inversão da lâmina sobre uma superfície lisa e compressão das fezes de forma a se obter um esfregaço uniforme com cerca de 22mm de diâmetro.

Das 913 amostras que retornaram para exame, 750 continham volume de fezes suficiente para serem submetidas também ao *Coprotest*®. Após processamento, conforme descrição no item 2.1.2, foi realizada a contagem dos ovos de *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e *S. mansoni* como descrito no item 2.1.3. Nas lâminas com elevado número de ovos, realizou-se a quantificação por amostragem, estimando-se o número total de ovos como descrito no item 2.1.4.

Essa metodologia de quantificação por amostragem foi também aplicada ao Kato-Katz. Para tanto, colocou-se o gabarito sobre o esfregaço fecal, contaram-se os ovos contidos nos dez campos e a média obtida foi multiplicada pelo número total de campos do esfregaço.

2.3. Comparação do “Coprotest quantitativo” com outros métodos de quantificação

2.3.1. Preparação das amostras

Foi selecionado um paciente cujo diagnóstico através de uma lâmina de Kato-Katz revelou carga parasitária de cerca de 100000 ovos por grama de fezes (opg) para *A. lumbricoides* e cerca de 1000 opg para *T. trichiura*. Em 50 gramas de fezes frescas desse indivíduo foram adicionados cerca de 50000 ovos de *S. mansoni*, de forma que a amostra passou a conter o correspondente a 1000 opg também para essa última espécie.

Os ovos de *S. mansoni* foram extraídos de fígados de hamsters experimentalmente infectados, através de trituração do tecido em liquidificador e posterior tamisação numa série de quatro peneiras, sendo que na última foram concentrados os ovos livres de detritos; o concentrado de ovos foi transferido para uma proveta graduada e ressuspenso em 50mL de salina

tamponada, na temperatura de 10°C para evitar eclosão (Araújo, 1985). Para se estimar o número de ovos contido na suspensão, foram pipetadas e examinadas, após homogeneização, três alíquotas de 0,1mL, verificando-se a média de 980 ovos por mL. A suspensão foi mantida em geladeira por 1 hora. Em seguida, o sedimento foi cuidadosamente aspirado e misturado às 50g de fezes que já continham ovos de *A. lumbricoides* e *T. trichiura*.

Com essa amostra inicial de 50g de fezes positivas, denominada amostra A, foi realizada diluição seriada ao dobro do material fecal, utilizando-se fezes totais de um outro indivíduo não parasitado. Ou seja, uma porção de 25g da amostra A foi misturada a igual volume de fezes negativas, obtendo-se a amostra B, metade dessa última foi utilizada para compor a amostra C e assim sucessivamente até que se obtiveram 16 amostras, classificadas de A a Q, pesando 25g cada uma. O esperado era que a cada diluição a amostra resultante contivesse a metade dos ovos da amostra anterior.

2.3.2. Processamento das amostras

As amostras obtidas da diluição seriada, após completa homogeneização, foram divididas em porções suficientes para processamento através dos seguintes métodos:

- “Coprotest quantitativo”, descrito e esquematizado anteriormente (Figura 2);
- Kato-Katz, descrito por Katz e cols.(1972) e esquematizado anteriormente (Figura 3);
- Ritchie modificado, processado conforme descrito por Knigth e cols. (1976) e esquematizado a seguir, na Figura 5;
- Stoll & Hausheer (1926), esquematizado a seguir, na Figura 6.

Foram examinadas cinco lâminas de cada amostra submetida a cada método.

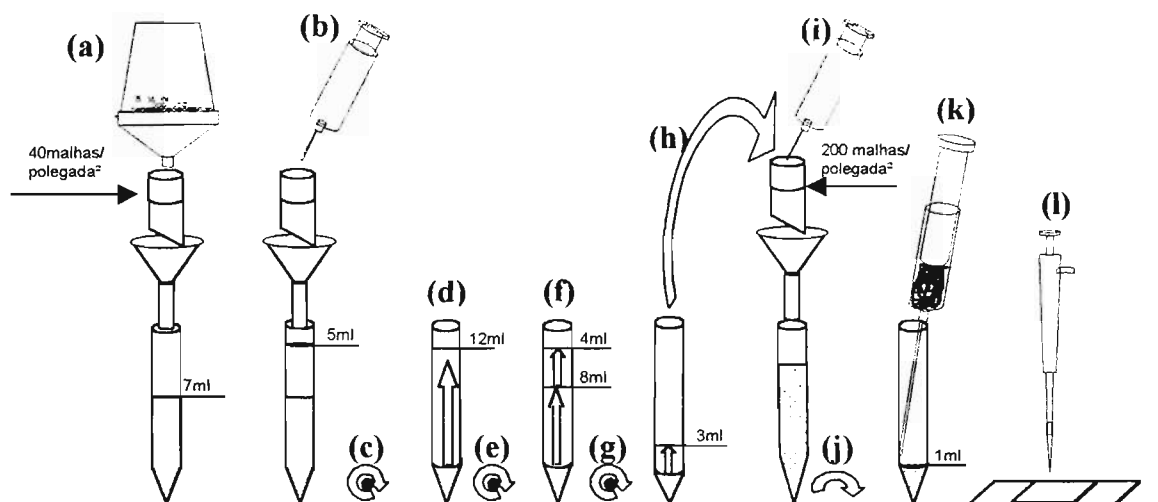


Figura 5: Esquema do processamento das fezes através do método de Ritchie modificado

- (a) Transferência de 7mL da suspensão fecal para um tubo de centrifuga de 15mL, passando por tela de 40 malhas por polegada quadrada (*);
- (b) lavagem da tela com 5mL de solução de formalina a 10% tamponada, utilizando uma seringa para forçar a passagem das partículas através da tela;
- (c) centrifugação durante 3 minutos a 2000 rpm;
- (d) descarte do sobrenadante e ressuspensão do sedimento com 12mL de solução a 10% de formalina tamponada;
- (e) outra centrifugação durante 3 minutos a 2000 rpm;
- (f) descarte do sobrenadante, ressuspensão do sedimento com 8mL de solução de álcool etílico tamponada(**) e adição de 4mL de éter etílico (nessa etapa o tubo deve ser tampado e agitado vigorosamente);
- (g) centrifugação durante 1 minuto a 1500 rpm, descarte do sobrenadante e limpeza da parede do tubo com haste de algodão;
- (h) ressuspensão do sedimento com 3mL de salina tamponada e transferência para outro tubo de centrifuga, coando em tela de 200 malhas por polegada quadrada;
- (i) lavagem da tela com 10mL de solução salina tamponada, pressionada com seringa;
- (j) sedimentação espontânea por uma hora;
- (k) aspiração cuidadosa do sobrenadante deixando permanecer 1mL de solução (tubo marcado anteriormente);
- (l) homogeneização do sedimento e preparação de lâminas com alíquotas de 50µL.

(*) As amostras fecais foram preparadas em kits Coprotest® dos quais foram retiradas as peneiras originais quando do processamento pelo método ora esquematizado.

(**) 17,6g ácido cítrico, 88g fosfato de sódio, 4000mL água morna, 1050mL álcool etílico 95%, 12mL Triton X-100.

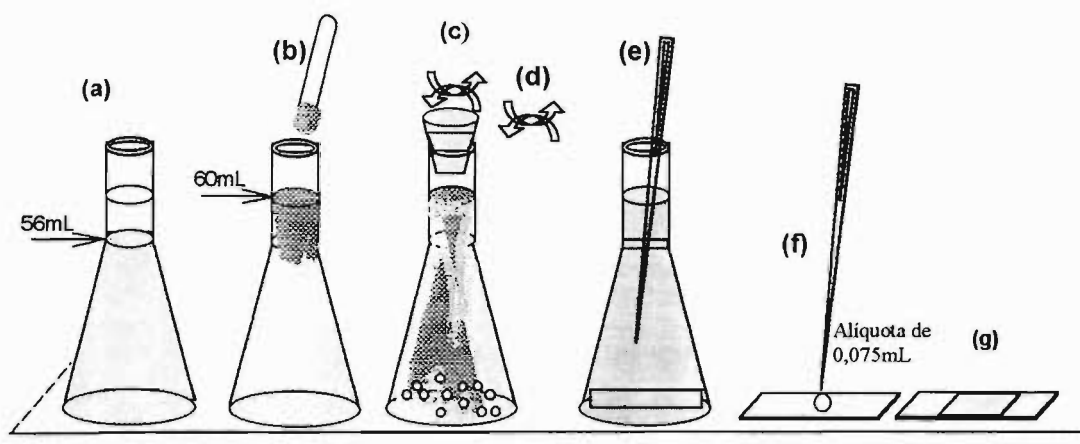


Figura 6: Esquema do processamento das fezes pelo método de Stoll & Hausheer

- (a) preenchimento do frasco tipo Erlenmeyer com NaOH 0,1N até a marca de 56mL;
- (b) introdução de fezes até que o conteúdo atinja a marca de 60mL;
- (c) introdução de pérolas de vidro, fechamento do frasco e diluição das fezes através de agitação vigorosa (deixar em repouso por uma hora ou mais);
- (d) após repouso, nova agitação, de forma a se obter uma suspensão homogênea;
- (e) retirada de alíquotas de 0,075mL, logo após a homogeneização;
- (f) lâmina preparada para o exame.

2.3.3. Determinação do número de ovos por grama de fezes

A contagem de ovos foi realizada nas cinco lâminas de cada método, procedendo-se a quantificação por amostragem naquelas com elevado número de ovos. O número de ovos por grama de fezes (opg) foi estimado pela média aritmética do número de ovos resultante da leitura das cinco lâminas, aplicando-se o fator de conversão para os métodos de Kato-Katz e Stoll & Hausheer, respectivamente 24 e 200, conforme já preconizado pelos respectivos autores (Katz e cols., 1972; Stoll & Hausheer, 1926). Para o “Coprotest quantitativo” e Ritchie modificado foi aplicado o fator de conversão obtido da padronização do *Coprotest*®, realizada no presente estudo (item 3.1.1).

2.4. Análise Estatística

O banco de dados, para armazenamento e análise dos resultados obtidos nas diferentes etapas do trabalho, foi organizado através do programa *Microsoft® Excel 97*. Esse programa permitiu sumarizar os dados através da estatística descritiva e representar graficamente o teste de Correlação Linear, empregado na comparação dos resultados obtidos através dos diferentes métodos coparassitológicos quantitativos. Utilizou-se ainda o programa Epi-Info, versão 6.04b de janeiro de 1997, para calcular o índice Kappa, e assim, testar a reprodutibilidade dos resultados qualitativos dos métodos diagnósticos empregados no estudo populacional.

3. Resultados

3.1. Padronização da quantificação pelo Sistema *Coprotest*®

3.1.1. Determinação do número de ovos por grama de fezes

Para se estimar o número de ovos por grama de fezes (opg) das amostras processadas pelo sistema *Coprotest*® foi necessário determinar um fator de conversão que permitisse estimar o número de ovos contido em um grama de fezes, a partir do número de ovos encontrados em uma lâmina examinada. Para a determinação desse fator de conversão foram consideradas as seguintes variáveis:

- o peso do material fecal depositado no coletor próprio do *kit Coprotest*®, resultante da média da pesagem de 200 amostras de diferentes indivíduos, que foi igual a 1,4g (desvio padrão: 0,08; coeficiente de variação: 0,05);
- o volume da suspensão fecal obtida da dissolução de 1,4g de fezes em 10mL de conservante, que foi de aproximadamente 11mL;
- o peso do material fecal contido em 7mL da suspensão, transferido para o tubo de centrífuga, estimado em cerca de 0,9g de fezes;
- o volume resultante da ressuspensão do sedimento obtido do processamento da amostra, 1mL, no qual estariam contidos os ovos das 0,9g de fezes processadas;
- o peso do material fecal contido em cada alíquota de 50 μ L examinada, ou seja, cerca de 0,045g de fezes;
- a proporção entre 1g e 0,045g de fezes, que é igual a 22,2.

Assim, adotou-se o fator 22 para a conversão do número de ovos em opg, a partir do número de ovos encontrados em uma lâmina preparada com

50 μ L do sedimento contendo cerca de 0,045g de fezes. Para aumentar a precisão do método, preconiza-se aplicar esse fator à média de número de ovos resultante da contagem em pelo menos duas lâminas.

3.1.2. Avaliação do “Coprotest quantitativo”

A avaliação da metodologia de quantificação pelo Sistema *Coprotest*® foi realizada utilizando-se quatro amostras fecais de diferentes indivíduos, previamente diagnosticadas como positivas para *A. lumbricoides*. Com esse ensaio, procurou-se avaliar a reprodutibilidade, examinando-se duas porções de uma mesma amostra fecal e, também, comparar os resultados do número de ovos por grama de fezes (opg) obtido do rastreamento completo da lâmina com o obtido na quantificação por amostragem. Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da quantificação de ovos por amostragem. Os resultados em opg obtidos na leitura por amostragem em comparação aos resultados obtidos por rastreamento completo das lâminas estão apresentados na Tabela 2. Já a Tabela 3 compara os resultados em opg obtidos para as quatro amostras, considerando-se a média do número de ovos obtida da leitura de quatro lâminas, sendo duas de cada *kit*, para cada amostra.

Tabela 1: Quantificação por amostragem em lâminas preparadas a partir de quatro amostras de fezes positivas para *A. lumbricoides*, processadas através do Sistema *Coprotest*®.

amostra fecal*	número de ovos por campo**	DP	CV	número de ovos por lâmina***
Aa1	8,6	1,3	15,70	1901
Aa2	9,1	1,5	16,75	2011
Ab1	9,4	2,2	23,09	2077
Ab2	8,4	1,6	19,60	1856

Ba1	2,6	0,5	19,86	575
Ba2	2,3	0,5	21,00	508
Bb1	2,6	0,5	19,86	575
Bb2	2,8	0,8	28,17	619

Ca1	0,6	0,8	140,55	133
Ca2	1,2	1,0	86,07	265
Cb1	0,9	1,3	142,96	199
Cb2	0,5	0,7	141,42	111

Da1	0,2	0,6	316,23	44
Da2	0,4	0,5	129,10	88
Db1	0,1	0,3	316,23	22
Db2	0,2	0,4	210,82	44

*A,B,C,D: amostras fecais de quatro pacientes diferentes; a,b: dois *kits* preparados para cada amostra; 1 e 2: duas alíquotas de 50 µl examinadas para cada *kit*.

** média obtida na contagem de ovos de dez campos da lâmina (vide Apêndice 1 para resultados por cada campo examinado).

*** número de ovos dado pela média dos dez campos multiplicada por 221 (vide item 2.1.4)

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação

Tabela 2: Comparação entre resultados de número de ovos, obtido pela quantificação por amostragem e por rastreamento completo da lâmina, em amostras positivas para *A. lumbricoides* processadas pelo sistema Coprotest®.

amostra fecal*	Número de ovos/lâmina		OPG**	
	quantificação por amostragem	rastreamento completo	quantificação por amostragem	rastreamento completo
Aa1	1901	-	41813	-
Aa2	2011	-	44244	-
Ab1	2077	-	45703	-
Ab2	1856	-	40841	-

Ba1	575	498	12641	10956
Ba2	508	554	11183	12188
Bb1	575	542	12641	11924
Bb2	619	587	13614	12914

Ca1	133	146	2917	3504
Ca2	265	137	5834	3288
Cb1	199	132	4376	3168
Cb2	111	142	2431	3408

Da1	44	19	972	456
Da2	88	17	1945	408
Db1	22	17	486	408
Db2	44	16	972	384

*A,B,C,D: quatro diferentes amostras fecais; a,b: dois kits preparados para cada amostra; 1 e 2: duas alíquotas de 50 µl examinadas para cada kit.

** OPG: número de ovos por grama de fezes = n° de ovos na lâmina multiplicado pelo fator 22 (vide item 3.1.1).
- número excessivo de ovos para contagem por rastreamento completo

Tabela 3: Comparação entre a metodologia de quantificação por amostragem e a de rastreamento completo da lâmina, para amostras com diferentes cargas de ovos de *A. lumbricoides*, processadas pelo Sistema *Coprotest*®.

Amostra fecal*	quantificação por amostragem			rastreamento completo		
	OPG	DP	CV	OPG	DP	CV
A	43150	2223,6	5,20	-	-	-
B	12519	1002,3	8,01	11996	809,6	6,75
C	3889	1537,5	39,53	3342	145,8	4,36
D	1094	611,8	55,92	414	30,2	7,29

*A,B,C,D: quatro diferentes amostras fecais com as quais foram preparados dois *kits* para cada uma delas (vide Tabelas 1).

OPG: média do número de ovos por grama de fezes obtida de quatro lâminas, para cada amostra (vide Tabela 2);

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação

- número excessivo de ovos para contagem por rastreamento completo

3.2. Aplicação do “Coprotest quantitativo” em estudo populacional

3.2.1. Resultados qualitativos

Das 750 amostras fecais provenientes de indivíduos residentes na cidade de Bananal-SP, processadas através do sistema *Coprotest*® e do método de Kato-Katz, 94 (12,5%) estavam positivas para alguma espécie de parasita. Na Tabela 4 são apresentados os resultados do ponto de vista qualitativo, independentemente do método empregado.

Tabela 4: Resultado do diagnóstico coproparasitológico de 750 amostras procedentes do município de Bananal-SP, processadas pelo Sistema Coprotest® e pelo método de Kato-Katz

PARASITA	casos detectados		
	número	%	
<i>Ascaris lumbricoides</i> *	20	2,7	
<i>Trichuris trichiura</i> *	31	4,1	
<i>Schistosoma mansoni</i> *	11	1,5	
Ancilostomatidae	10	1,3	
<i>Enterobius vermicularis</i>	1	0,1	
<i>Strongyloides stercoralis</i>	6	0,8	
<i>Giardia duodenalis</i>	16	2,1	
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	1	0,1	
<i>Entamoeba coli</i>	27	3,6	
<i>Entamoeba hartmanni</i>	2	0,3	
<i>Endolimax nana</i>	6	0,8	
<i>Iodamoeba butschlii</i>	1	0,1	
	com uma espécie	79	10,5
positivos	com duas espécies	11	1,5
	com três espécies	4	0,5
negativos		656	87,5
TOTAL		750	100,0

* as três primeiras espécies foram diagnosticadas através do Coprotest® e/ou Kato-Katz e as demais foram detectadas somente através do Coprotest®.

Na Tabela 5 são comparados os resultados qualitativos obtidos através do sistema *Coprotest*® e do método de Kato-Katz, para as espécies *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e *S. mansoni*.

Tabela 5: Concordância entre o sistema *Coprotest*® (CP) e o método de Kato-Katz (KK) na detecção de ovos de helmintos nas amostras fecais procedentes do município de Bananal, SP.

		<i>A. lumbricoides</i>			<i>T. trichiura</i>			<i>S. mansoni</i>		
		CP			CP			CP		
		+	-		+	-		+	-	
KK	+	18	1	19	28	2	30	8	2	10
	-	1	730	731	1	719	720	1	739	740
		19	731	750	29	721	750	9	741	750
Índice Kappa		0,946			0,947			0,840		

3.2.2. Resultados quantitativos

Nas Tabelas 6, 7 e 8 estão apresentados os resultados em número de ovos por grama de fezes (opg), respectivamente para as espécies *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e *S. mansoni*, obtidos através do “Coprotest quantitativo” e do método de Kato-Katz, nas amostras procedentes do município de Bananal. Foram ainda indicados os níveis de cargas parasitárias, os quais foram classificados em leve, moderada e intensa, de acordo com os parâmetros recomendados pela Organização Mundial de Saúde (Engels e cols., 1996; Albanico e cols., 1999). A Figura 7 mostra as curvas e os coeficientes de correlação resultantes da comparação entre o “Coprotest quantitativo” e o método de Kato-Katz na quantificação de ovos das três espécies de helmintos.

Tabela 6: Comparação dos resultados em número de ovos por grama de fezes, obtidos para *A. lumbricoides*, em amostras fecais procedentes do município de Bananal, SP, processadas através do "Coprotest quantitativo" e do método de Kato-Katz.

NÚMERO DE OVOS POR GRAMA DE FEZES*				
Número de ordem	Método			
	CP	n _{cp}	KK	n _{cp}
1	0	N	60	L
2	11	L	48	L
3	22	L	0	N
4	22	L	24	L
5	286	L	276	L
6	418	L	384	L
7	858	L	3144	L
8	1089	L	3960	L
9	1408	L	2220	L
10	1463	L	3132	L
11	1573	L	4836	L
12	2607	L	6468	M
13	2750	L	3468	L
14	3113	L	4560	L
15	4939	L	11352	M
16	12892	M	23868	M
17	21636	M	31056	M
18	38896	M	56244	I
19	42537	M	70236	I
20	62480	I	97068	I
Média Geométrica	1582	L	3700	L
Média Aritmética	9950	M	16120	M
Desvio Padrão	17678		27264	

* Número de ovos por grama de fezes resultante da média do número de ovos contados em duas lâminas, multiplicado pelo fator de correção definido para cada um dos métodos quantitativos: fator 22 para "Coprotest quantitativo" (CP) e fator 24 para o método de Kato-Katz (KK). (vide Apêndice 2 para resultados em número de ovos por lâmina)

n_{cp} - níveis de carga parasitária: leve (L); moderada (M) ou intensa (I); N: negativo.

Tabela 7: Comparação dos resultados em número de ovos por grama de fezes, obtidos para *T. trichiura*, em amostras fecais procedentes do município de Bananal, SP, processadas através do "Coprotest quantitativo" e do método de Kato-Katz.

NÚMERO DE OVOS POR GRAMA DE FEZES*				
Número de ordem	Método			
	CP	ncp	KK	ncp
1	0	N	12	L
2	0	N	12	L
3	11	L	0	N
4	11	L	36	L
5	22	L	72	L
6	33	L	48	L
7	33	L	72	L
8	33	L	72	L
9	33	L	96	L
10	33	L	108	L
11	33	L	156	L
12	44	L	132	L
13	55	L	48	L
14	55	L	60	L
15	55	L	96	L
16	55	L	132	L
17	66	L	108	L
18	66	L	120	L
19	88	L	156	L
20	110	L	60	L
21	143	L	216	L
22	143	L	288	L
23	176	L	312	L
24	176	L	324	L
25	253	L	276	L
26	737	L	1356	M
27	858	L	1380	M
28	1023	M	1596	M
29	1804	M	2760	M
30	2354	M	3336	M
31	2431	M	3096	M

Média Geométrica	107	M	173	M

Média Aritmética	353	L	533	L
Desvio Padrão	668		938	

* Número de ovos por grama de fezes resultante da média do número de ovos contados em duas lâminas, multiplicado pelo fator de correção definido para cada um dos métodos quantitativos: fator 22 para "Coprotest quantitativo" (CP) e fator 24 para o método de Kato-Katz (KK). (vide Apêndice 3 para resultados em número de ovos por lâmina)
cp - níveis de carga parasitária: leve (L); moderada (M) ou intensa (I); N: negativo.

Tabela 8: Comparação dos resultados em número de ovos por grama de fezes, obtidos para *S. mansoni*, em amostras fecais procedentes do município de Bananal, SP, processadas através do “Coprotest quantitativo” e do método de Kato-Katz.

NÚMERO DE OVOS POR GRAMA DE FEZES*				
Número de ordem	Método			
	CP	ncp	KK	ncp
1	0	N	12	L
2	0	N	24	L
3	11	L	0	N
4	11	L	24	L
5	11	L	36	L
6	11	L	60	L
7	22	L	36	L
8	77	L	60	L
9	99	L	276	M
10	187	M	192	M
11	198	M	216	M
Média Geométrica	36	L	57	L
Média Aritmética	57	L	85	L
Desvio Padrão	74		95	

* Número de ovos por grama de fezes resultante da média do número de ovos contados em duas lâminas, multiplicado pelo fator de correção definido para cada um dos métodos quantitativos: fator 22 para “Coprotest quantitativo” (CP) e fator 24 para o método de Kato-Katz (KK).

(vide Apêndice 4 para resultados em número de ovos por lâmina)

ncp - níveis de carga parasitária: leve (L); moderada (M) ou intensa (I); N: negativo.

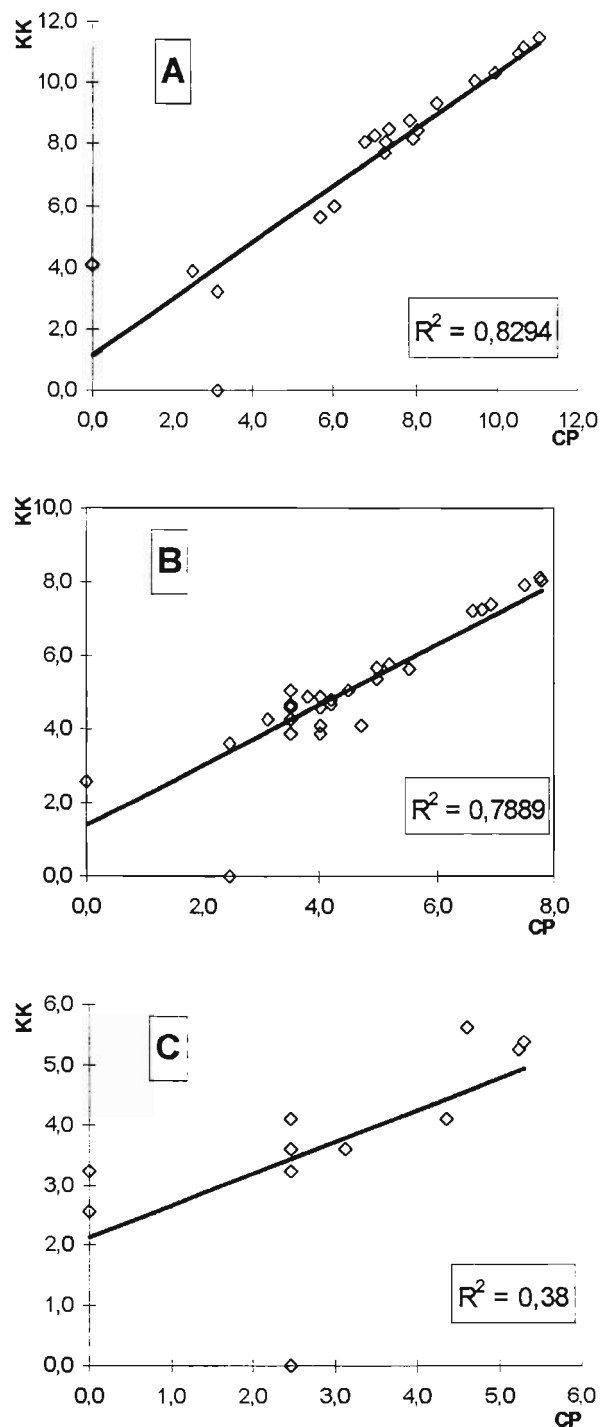


Figura 7: Comparação entre os resultados quantitativos obtidos através do “Coprotest Quantitativo” (CP) e do Kato-Katz (KK), para as espécies *A. lumbricoides* (A), *T. trichiura* (B) e *S. mansoni* (C), em amostras procedentes do município de Bananal, SP. [Número de ovos por grama de fezes(opg) representado por $\ln(\text{opg}+1)$].

3.3. Comparação entre “Coprotest quantitativo” e outros métodos de quantificação

A comparação entre os métodos foi realizada utilizando-se dezesseis amostras fecais com número decrescente de ovos, obtidas da diluição seriada ao dobro de material fecal positivo para *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e *S. mansoni*. Essas amostras foram submetidas ao “Coprotest quantitativo” e aos métodos de Kato-Katz, Stoll & Hausheer e Ritchie modificado. Na Tabela 9 estão apresentados os resultados em número de ovos por grama de fezes (opg) obtidos para cada espécie a partir da contagem em cinco lâminas para cada método. Para *A. lumbricoides* foram encontrados ovos até a amostra Q, que corresponde à mais diluída, nos vários métodos empregados, com exceção do método de Stoll & Hausheer. Esse método também foi o que mostrou menor capacidade de detecção de ovos em relação aos demais, para as outras duas espécies estudadas. Na Figura 8 são mostrados as curvas e os coeficientes de correlação resultantes da comparação entre o “Coprotest quantitativo” e os outros métodos utilizados. As variações observadas na quantificação de ovos em cinco lâminas de cada método estão apresentadas na Figura 9.

Tabela 9: Comparação dos resultados em número de ovos por grama de fezes, obtidos para três espécies de helmintos, em amostras fecais com números decrescentes de ovos, processadas através de quatro diferentes métodos quantitativos.

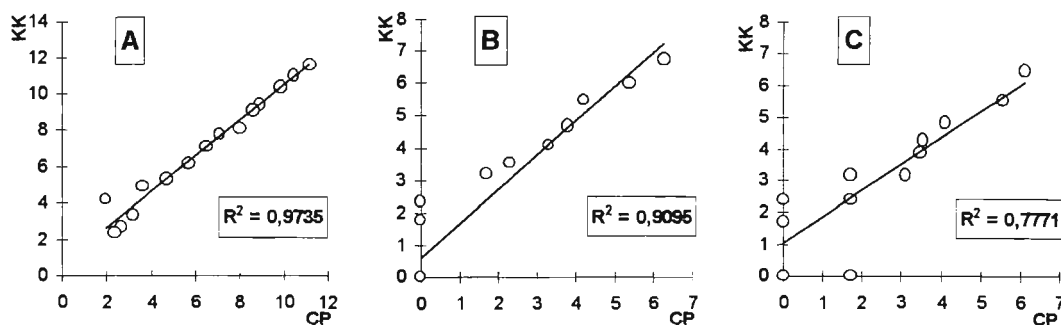
NÚMERO DE OVOS POR GRAMA DE FEZES *												
ESPÉCIE												
Método** série***	<i>A. lumbricoides</i>				<i>T. trichiura</i>				<i>S. mansoni</i>			
	CP	KK	ST	RT	CP	KK	ST	RT	CP	KK	ST	RT
A	67679	113196	96360	80223	515	859	1440	1175	453	658	1080	484
B	34715	64067	46160	38993	207	413	560	304	264	254	440	220
C	18476	32772	27080	25185	66	235	240	132	62	125	0	119
D	7390	12879	9440	12155	44	110	120	75	35	72	40	57
E	5135	8795	5960	6692	26	58	40	35	31	48	40	40
F	2838	3331	2720	3115	9	34	0	22	22	24	40	22
G	1201	2438	1520	1311	4	24	0	13	4	24	40	4
H	651	1147	960	761	0	10	40	9	4	10	0	4
I	286	485	480	348	0	5	0	0	0	5	40	4
J	110	206	240	136	0	0	0	4	0	5	0	4
L	35	130	120	66	0	0	0	0	4	10	0	0
M	31	62	40	57	0	0	0	4	0	10	0	0
N	22	29	40	26	0	0	0	0	4	0	0	0
O	13	14	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0
P	9	10	0	4	0	0	0	0	0	5	0	0
Q	9	10	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0

* Número de ovos por grama de fezes resultante da média do número de ovos contados em cinco lâminas, multiplicado pelo fator de correção definido para cada um dos métodos quantitativos. (vide Apêndices de 5 a 8 para resultados em número de ovos por lâmina).

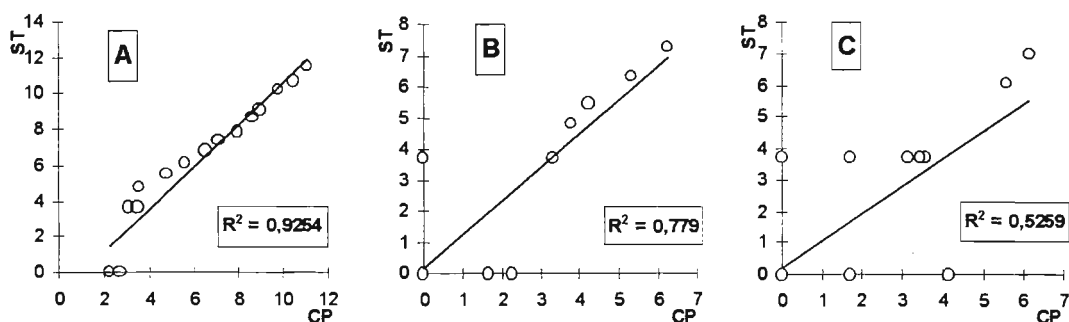
** CP: Coprotest quantitativo; KK: Kato-Katz; ST: Stoll & Hausheer; RT: Ritchie modificado.

*** Série B a Q: diluição da amostra de fezes em razão 2 a partir da amostra A, experimentalmente preparada, contendo ovos das três espécies de helmintos, *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e *S. mansoni*.

CP x KK



CP x ST



CP x RT

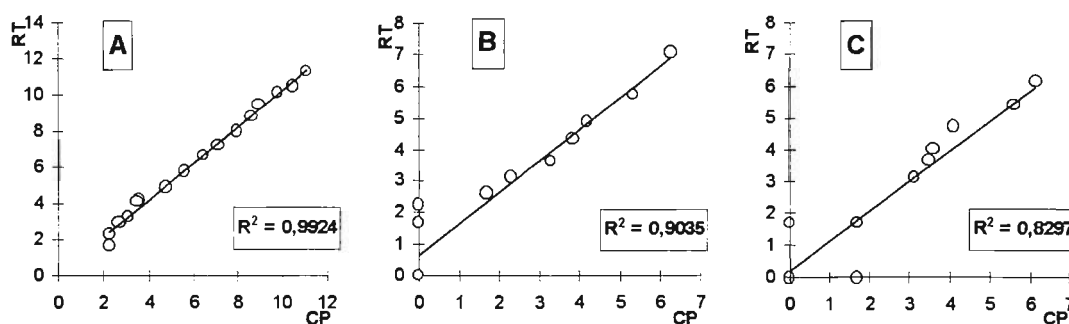


Figura 8: Comparação entre os resultados do "Coprotest Quantitativo" (CP) com os métodos de Kato-Katz (KK), Stoll & Hausheer (ST) e Ritchie modificado (RT) em amostras fecais com diferentes cargas de ovos das espécies: A - *A. lumbricoides*; B - *T. trichiura* e C - *S. mansoni*. [Número de ovos por grama de fezes (opg) representado por $\ln(\text{opg}+1)$]

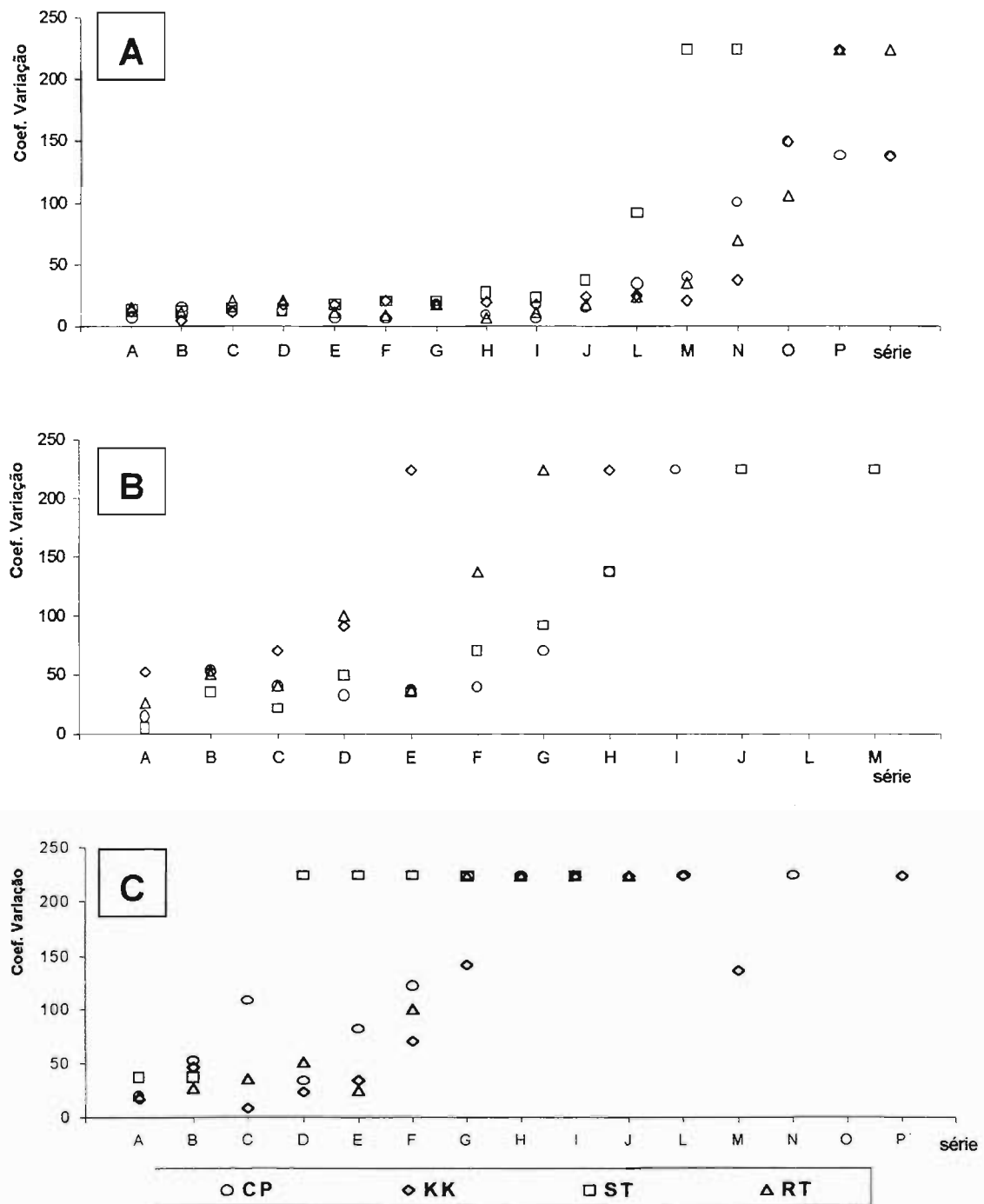


Figura 9: Comparação entre os coeficientes de variação resultantes da diferença no número de ovos por grama de fezes, obtidos na quantificação em cinco lâminas dos métodos "Coprotest quantitativo" (CP), Kato-Katz (KK), Stoll & Hausheer e Ritchie modificado, para as amostras B a Q preparadas experimentalmente por diluição seriada de razão 2 a partir da amostra A, contendo ovos das espécies de helmintos: A - *A. lumbricoides*; B - *Trichuris trichiura* e C - *S. mansoni*.

4. Discussão

A aplicação de diferentes métodos de exame coproparasitológico muitas vezes é necessária tendo em vista a variabilidade morfológica e biológica apresentada pelos parasitas passíveis de serem diagnosticados através das fezes. Nem sempre uma técnica apropriada ao encontro de ovos será eficiente na detecção de larvas de helmintos e cistos ou oocistos de protozoários. Os estudos populacionais ou programas de controle são dirigidos com frequência a um parasita em especial ou a um grupo de espécies parasitárias, como por exemplo no controle da esquistossomose ou controle das geohelmintíases. A utilização de técnicas capazes de detectar outros elementos parasitários que não somente aqueles em enfoque poderia trazer maiores benefícios à população. Por outro lado, a utilização de múltiplas técnicas tornaria dispendiosos os amplos trabalhos de campo.

Knight e cols. (1976), ao proporem a técnica de concentração em formol-éter no diagnóstico quantitativo da esquistossomose, discutiram as vantagens de se aplicar uma metodologia que permitisse a contagem de ovos de *Schistosoma mansoni*, concomitante ao diagnóstico qualitativo dos parasitas intestinais. Outros autores (Albonico e cols., 1996) têm realizado seus estudos associando ao método de Kato-Katz, para o diagnóstico quantitativo das geohelmintíases, a técnica de concentração em formol-acetato de etila, para o diagnóstico qualitativo, detectando assim, além dos ovos, larvas de helmintos e cistos ou oocistos de protozoários.

No presente estudo, a técnica de concentração em formol-acetato de etila foi padronizada para a quantificação de ovos de helmintos. A padronização da técnica quantitativa foi realizada utilizando-se o sistema Coprotest®, kit comercial já empregado na rotina laboratorial para o diagnóstico genérico de elementos parasitários nas fezes. O kit utilizado

propicia a coleta de volume padronizado de fezes que, convertido em gramas, permitiu definir um fator de conversão para ovos por grama de fezes (opg), unidade classicamente empregada para estimar a carga parasitária dos indivíduos infectados. A técnica de quantificação proposta foi avaliada inicialmente utilizando-se amostras fecais com diferentes cargas de ovos de *Ascaris lumbricoides*.

Tendo em vista o encontro de pessoas apresentando elevado número de ovos dessa espécie nas fezes, desenvolveu-se uma metodologia de quantificação por amostragem. Nas amostras utilizadas para padronização, que continham mais de 10000 opg, correspondendo à contagem de aproximadamente 500 ovos na lâmina examinada, os resultados obtidos na quantificação por amostragem foram comparáveis aos obtidos através do rastreamento completo da lâmina. Já nas amostras com carga abaixo de 3500 opg, correspondendo à contagem de aproximadamente 150 ovos na lâmina, observou-se elevado coeficiente de variação quando aplicada a metodologia de quantificação por amostragem (Amostras C e D - Tabelas 1, 2 e 3). Com esses resultados foi possível estabelecer a metodologia de quantificação empregada nas etapas seguintes do trabalho.

Nas amostras vindas do campo, processadas através do *Coprotest*®, a metodologia de quantificação por amostragem foi aplicada naquelas amostras que continham acima de 5000 opg, correspondendo a aproximadamente 200 ovos por lâmina. Esse limite foi definido ao se observar, durante a leitura para diagnóstico qualitativo das fezes, que nas amostras com essa carga de ovos de *A. lumbricoides*, pelo menos um ovo está presente em cada campo examinado ao microscópio, com aumento de 100x. Quando se aplicou essa metodologia de quantificação por amostragem nas lâminas preparadas através do método de Kato-Katz, observou-se que os ovos ficam menos espalhados na lâmina. O esfregaço fecal, preparado com aproximadamente 22 mm de diâmetro, apresenta área menor do que a lamínula de vidro utilizada no *Coprotest*® (24x32mm), o que propicia maior proximidade entre os ovos. Assim, foi possível realizar a

quantificação por amostragem nas lâminas de Kato-Katz que apresentavam número de ovos por grama de fezes (opg) a partir de 2500, correspondendo a cerca de 100 ovos por lâmina (Apêndice 2).

Nas amostras preparadas em laboratório, com quantidade decrescente de ovos, realizou-se a quantificação por amostragem para *A. lumbricoides* nas lâminas resultantes do processamento das amostras de A a E, através do “Coprotest quantitativo” e do método de Ritchie modificado e das amostras de A a G, do método de Kato-Katz. Quanto ao método de Stoll & Hausheer que, diferentemente dos demais, se baseia na diluição das fezes, a metodologia de quantificação por amostragem pôde ser aplicada somente na leitura das lâminas das amostras A e B, nas quais o número de ovos era maior que 200 (Apêndices 5, 6, 7 e 8). O coeficiente de variação obtido na contagem em cinco lâminas de cada uma das amostras pode ser considerado aceitável e, de certa forma, valida o procedimento adotado para aquelas amostras vindas do campo que foram quantificadas por amostragem.

O “Coprotest quantitativo”, quando aplicado em estudo populacional, permitiu levantar a prevalência momentânea das parasitoses diagnosticáveis pelo exame das fezes, concomitante à quantificação de ovos de *S. mansoni*, *A. lumbricoides* e *T. trichiura*. Os resultados qualitativos mostram a característica de baixa endemicidade para enteroparasitas na área, com reduzido número de pessoas infectadas e a maioria portanto somente uma espécie de parasita (Tabela 4).

Comparando-se os resultados qualitativos do *Coprotest*® com os obtidos pelo método de Kato-Katz, para as espécies *S. mansoni*, *A. lumbricoides* e *T. trichiura*, observou-se boa concordância (Tabela 5). Os resultados discordantes foram observados nas amostras que continham número reduzido de ovos. Nas amostras produzidas em laboratório, elevado coeficiente de variação ocorreu quando o número de ovos encontrado na lâmina foi inferior a cinco. Esse número de ovos, expresso em ovos por

grama de fezes (opg), com a aplicação do fator de conversão desses dois métodos, estaria abaixo de 100 opg (Tabela 9 e Apêndice 5 - amostras de L a Q).

Essa limitação dos métodos em detectar ovos em amostras de indivíduos com baixa carga parasitária pode levar a uma determinação subestimada da prevalência das parasitoses. Estudos nesse sentido foram realizados em área de baixa endemicidade para *S. mansoni*, mostrando que a taxa de prevalência é proporcional ao número de lâminas examinadas (De Vlas & Gryseels, 1992). Tendo em vista as dificuldades técnicas para a realização de múltiplas lâminas ou para o exame de mais de uma amostra de cada indivíduo, De Vlas e cols. (1992) propuseram a aplicação de um modelo matemático para a determinação da prevalência da esquistossomose em áreas de baixa transmissão, de acordo com o número de lâminas examinadas através do método de Kato-Katz. Essa dificuldade poderia ser sanada com a utilização do *Coprotest*[®], já que o volume de matéria fecal processada, cerca de um grama, é teoricamente 20 vezes maior que o contido na lâmina preparada através do método de Kato-Katz. Mesmo com a leitura de maior número de lâminas para cada um desses dois métodos, realizada neste estudo em cinco lâminas com as amostras preparadas em laboratório (Apêndices 5 a 8), observou-se que existe um limiar de detecção que precisa ser mais bem estudado.

Quanto aos demais parasitas diagnosticados nas amostras vindas do campo, a frequência foi determinada somente através dos resultados obtidos no *Coprotest*[®]. Vale ressaltar que os casos de *Strongyloides stercoralis*, *Giardia duodenalis* e *Entamoeba histolytica/dispar*, de difícil detecção através do método de Kato-Katz, deixariam de ser diagnosticados na população, não fosse a aplicação do *Coprotest*[®]. Além disso, a detecção de protozoários comensais deve ser considerada importante, já que são transmitidos através de mecanismos idênticos àqueles dos protozoários patogênicos, servindo como indicadores epidemiológicos. Sua presença significa existir contaminação de água e alimentos, além de maus hábitos de

higiene por parte da população, condições estas propícias à ocorrência de outras espécies parasitárias. Esses achados reforçam a idéia da importância de se empregar um método genérico nos estudos populacionais.

Inicialmente, pretendia-se comparar os resultados entre os dois métodos na detecção de espécies da Família Ancilostomatidae, mas a impossibilidade de leitura das lâminas de Kato-Katz em tempo hábil para a visualização desses ovos prejudicou essa comparação (Giazzi, 1982). Assim, a determinação da frequência para essas espécies seguiu os resultados do *Coprotest*®. Em duas amostras positivas para ancilostomídeos o diagnóstico foi dado pelo encontro de larvas. Em estudos de larga escala existe muitas vezes a dificuldade de recolher, transportar e armazenar as amostras em tempo e condições adequadas. Ocorre também que o paciente nem sempre segue as instruções quanto a conservar as fezes frescas em local protegido do calor. Esses fatos podem dar condições ao desenvolvimento das larvas e eclosão dos ovos de ancilostomídeos, prejudicando o diagnóstico através do método de Kato-Katz. A imersão da amostra fecal em solução conservadora no momento da coleta pelo próprio paciente, como idealizado no *Coprotest*®, contribuiria para solucionar esses problemas.

A determinação da prevalência das infecções parasitárias constitui-se em importante instrumento para o estudo das mesmas, permitindo indicar estratégias para o planejamento de ações de controle e mesmo para medir o impacto dessas ações. Quando analisada pela sua distribuição espacial, permite identificar focos de transmissão e essa variável, somada à análise segundo os atributos da população, permite visualizar a dinâmica de transmissão das enfermidades numa determinada área, fornecendo inclusive indicações quanto a variações de susceptibilidade dos indivíduos aos diferentes agentes patogênicos (Gioia, 1995). Para enteroparasitas que se multiplicam dentro do hospedeiro, caso de protozoários e de *S. stercoralis* dentre os helmintos, o estudo da prevalência por si só permite

medir o significado desse parasitismo na população, indicando a proporção de indivíduos infectados. Já para os demais helmintos diagnosticados através das fezes, a estimativa da intensidade das infecções constitui-se em outra importante variável a ser considerada nos estudos epidemiológicos (Bundy e cols., 1992).

A intensidade das infecções por helmintos intestinais é definida como o número de parasitas albergados pelo hospedeiro. Os estudos para sua avaliação podem ser realizados através da contagem de vermes recuperados após medicação (Hall e cols., 1992) ou, ainda, mais comumente, através da determinação do número de ovos contidos em volume pré-determinado de fezes, sendo portanto, uma estimativa da intensidade da infecção (Albonico e cols., 1999). No caso de *S. mansoni*, esta última metodologia é a empregada, mesmo porque as formas adultas não são expelidas após tratamento.

A fim de padronizar os estudos e permitir comparações, a maioria dos autores adota os parâmetros recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para estimar a intensidade das infecções. Dependendo do número de ovos por grama de fezes (opg), classifica-se a carga parasitária em três diferentes níveis: leve, moderada e intensa. Considera-se moderada quando o número de ovos por grama de fezes (opg) varia entre 5000 e 50000 para *A. lumbricoides*; entre 1000 e 10000 para *T. trichiura*; entre 2000 e 5000 para Ancylostomatidae e entre 100 e 400 para *S. mansoni*. Abaixo e acima dessas faixas, considera-se a intensidade da infecção como leve ou intensa, respectivamente (Engels e cols., 1996; Albanico e cols., 1999).

No trabalho de campo realizado no presente estudo, foram avaliadas quantitativamente as espécies *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e *S. mansoni*, observando-se certa discordância de resultados entre os métodos empregados (Tabelas 6, 7 e 8; Figura 7). Entretanto, quando se leva em consideração a classificação das cargas parasitárias nos diferentes níveis, leve, moderada e intensa, foi possível verificar resultados próximos entre o "Coprotest quantitativo" e o método de Kato-Katz. Considerando-se somente

as amostras positivas pelos dois métodos, observa-se concordância em níveis de infecção em 14 dos 18 casos para a espécie *A. lumbricoides* (exceto os números 12, 15, 18 e 19 – Tabela 6); em 22 dos 24 casos para *T. trichiura* (exceto os números 26 e 27 – Tabela 7) e em cinco dos seis casos para *S. mansoni* (exceto o número 9 – Tabela 8). Vale ressaltar que o número reduzido de indivíduos positivos para helmintos na área selecionada para o estudo dificultou uma avaliação minuciosa em relação aos diferentes níveis de carga parasitária.

Essa estimativa da intensidade das infecções por helmintos, especialmente *A. lumbricoides*, vem sendo utilizada como indicador das condições de saneamento ambiental ou ainda, como parâmetro para medir os efeitos da quimioterapia em massa (Muller e cols., 1989; Hall e cols., 1992; Schulz & Kroeger, 1992; Bundy, 1994; Machado e cols., 1996; Olsen, 1998; Albonico e cols., 1999; Mascie-Taylor e cols., 1999). Neste contexto, estima-se a carga parasitária pela média do número de ovos por grama de fezes dos diferentes indivíduos acometidos pela parasitose, buscando avaliar o comportamento dessa variável na comunidade como um todo. Sendo assim, o “Coprotest quantitativo” mostra-se adequado a essa finalidade, já que apresenta resultados próximos ao Kato-Katz, somando-se a isso a vantagem de detectar muitas outras espécies parasitárias, além daquelas diagnosticáveis pelo último método, através do esfregaço fecal tamisado.

A discordância de resultados quantitativos nas amostras vindas do campo foi mais expressiva para a espécie *S. mansoni* (Figura 7). Esse fato pode ser explicado pela baixa carga parasitária apresentada pela maioria dos indivíduos que cederam as amostras, com conseqüente falseamento de resultado por um dos métodos utilizados ou, ainda, pelo reduzido número de observações, limitante para o teste matemático empregado.

Para melhor avaliar o “Coprotest quantitativo” e melhor entender as diferenças observadas no trabalho de campo, amostras com número

decrecente de ovos de *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e *S. mansoni* foram produzidas em laboratório e processadas pelo “Coprotest quantitativo”, comparando-se os resultados com os de outros métodos de quantificação. Além do Kato-Katz, utilizou-se o método de Stoll & Hausheer, que se baseia na diluição do material fecal em hidróxido de sódio, e o de Ritchie modificado, método de concentração no qual o *Coprotest*® é baseado.

Os resultados obtidos através do método de Kato-Katz, mostrando maior número de ovos em relação às demais metodologias quantitativas empregadas no presente estudo (Tabela 9), vêm de encontro à observação de outros autores (Katz e cols., 1970; Knigh e cols., 1976) de que a tamisação do material fecal, como efetuado neste método, propicia concentração de ovos. Katz e cols. (1970), comparando a taxa de recuperação de ovos de *S. mansoni* aderidos a fezes humanas processadas através do método de Kato, com e sem tamisação da matéria fecal, verificaram maior concentração de ovos no material tamisado. Observações semelhantes foram realizadas por Knight e cols.(1976) em amostras clínicas com diferentes cargas de ovos dessa mesma espécie, verificando que a média de ovos recuperados em fezes tamisadas foi 38% maior que no material não tamisado. Sendo assim, é importante considerar esse aspecto ao se interpretar os resultados obtidos através do método de Kato-Katz.

Nas amostras produzidas em laboratório demonstrou-se, em geral, concordância entre o “Coprotest quantitativo” e os outros métodos de quantificação utilizados (Figura 8). Resultados discordantes mesmo para *A. lumbricoides* foram observados nas amostras com número reduzido de ovos, verificando-se coeficiente de variação elevado entre as cinco lâminas examinadas para cada método (Figura 9). O método que apresentou resultados mais próximos aos obtidos através do “Coprotest quantitativo” foi o de Ritchie modificado, provavelmente por estarem baseados num mesmo princípio. Estes dados explicam em parte a falta de concordância observada entre o “Coprotest quantitativo” e Kato-Katz na quantificação de ovos de *S. mansoni*, nas amostras de campo, tendo em vista a baixa carga parasitária

dos pacientes esquistossomóticos quando comparada às duas outras espécies parasitárias avaliadas no presente estudo. Os resultados do presente trabalho indicam necessidade de se avaliar criticamente dados quantitativos obtidos em inquéritos epidemiológicos realizados em áreas de baixa endemicidade, independentemente da metodologia quantitativa empregada.

O método quantitativo padronizado no presente estudo, a que se denominou "Coprotest quantitativo", mostrou ser de aplicação viável em trabalhos de campo, fornecendo resultados comparáveis ao do Kato-Katz nas amostras com cargas elevadas de ovos, como é comum ocorrer nos casos de *A. lumbricoides*. A falta de concordância de resultados observados com relação ao *S. mansoni* reflete apenas os baixos níveis de carga parasitária comumente encontrados para esta parasitose. Assim, a possibilidade de se diagnosticar infecções por espécies parasitárias não passíveis de serem detectadas através do Kato-Katz, como cistos e oocistos de protozoários, além de larvas de helmintos, fazem do "Coprotest quantitativo" um método importante que merece ser mais bem avaliado e aperfeiçoado para aplicação em larga escala.

As vantagens observadas com o uso do "Coprotest quantitativo" no inquérito populacional realizado no presente estudo permitem sugerir sua aplicação em estudos epidemiológicos. Entretanto, deve-se lembrar que seu emprego requer um laboratório com centrífuga, além da aquisição de *kits Coprotest®* e outros suprimentos básicos que a técnica exige. Esses fatores podem ser limitantes para sua aplicação, se comparada com a estrutura necessária quando o método de escolha é o Kato-Katz. Há que se levar em consideração, portanto, o custo-benefício do programa a ser desenvolvido.

5. Conclusão

O *kit* comercial *Coprotest*[®], baseado no método coproparasitológico de concentração em formol-acetato de etila, permitiu a padronização de uma metodologia de quantificação de ovos de helmintos nas fezes; tal foi possível em virtude de possibilitar a coleta de volume padronizado de matéria fecal que, convertido em gramas, permitiu definir um fator de conversão para se calcular o número de ovos por grama de fezes, unidade empregada para se estimar a carga parasitária de indivíduos infectados.

A metodologia de quantificação padronizada no presente estudo, a que se denominou “Coprotest quantitativo”, quando aplicada em estudo populacional, mostrou resultados comparáveis ao método de Kato-Katz, ao se classificar em níveis de infecção os casos de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *Schistosoma mansoni*, seguindo os parâmetros recomendados pela Organização Mundial de Saúde para os estudos epidemiológicos.

O “Coprotest quantitativo” mostrou resultados comparáveis aos outros métodos de quantificação, quando empregado na quantificação de ovos de *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e *S. mansoni*, em amostras preparadas em laboratório, com quantidade decrescente de ovos. Coeficiente de variação elevado foi observado em amostras com reduzido número de ovos, fato que pode explicar os resultados discordantes entre o “Coprotest quantitativo” e o método de Kato-Katz em amostras de indivíduos com intensidade de infecção leve, estudadas no trabalho de campo.

O “Coprotest quantitativo”, além de ter possibilitado a contagem de ovos de helmintos, permitiu levantar a frequência de outras espécies parasitárias, dificilmente diagnosticáveis através do método de Kato-Katz, como *Strongyloides stercoralis*, *Giardia duodenalis* e outros protozoários.

Essa característica de possibilitar a detecção de diferentes elementos parasitários nas fezes, concomitante à quantificação de ovos, permite sugerir a aplicação do “Coprotest quantitativo” em estudos epidemiológicos, tanto para a determinação da prevalência de parasitoses diagnosticáveis através das fezes, como para a estimativa de intensidade das infecções por helmintos.

6. Referências Bibliográficas

ALBANICO, M.; SHAMLAYE, N.; SHAMLAYE, C.; SAVIOLI, L. Control of intestinal parasitic infections in Seychelles: a comprehensive and sustainable approach. Bull WHO, v. 74, n.5, p. 577-86. 1996.

ALBANICO, M.; STOLTZFUZ, R. J.; SAVIOLI, L.; CHWAYA, H. M.; D'HARCOURT, E. A controlled evaluation of two school-based anthelmintic chemotherapy regimens on intensity of intestinal helminth infections. Int. J. Epidemiology, v. 28, p. 591-6, 1999.

AMATO NETO, V.; CAMPOS, R.; PINTO, P. L. S.; MATSUBARA, L.; BRAZ, L. M. A.; MIYAMOTO, A.; FOSTER, R.; NASCIMENTO, S. A. B.; SOUZA, H. B. W. T.; MOREIRA, A. A. B. Avaliação da utilidade do Coprotest para exame parasitológico das fezes. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. São Paulo, v.44, n.4, p.153-5, 1989.

ANDERSON, R. M. & MAY, R. M. Helminth Infections of Humans: Mathematical Models, Population Dynamics, and Control. Adv. Parasitol., v.24, p. 35-47, 1985.

ARAÚJO, S.M. Observações sobre a suscetibilidade de *Biophalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835) ao *Schistosoma mansoni* Samborn, 1907 e sua importância na expansão da esquistossomose mansônica no Brasil. São Paulo, 1985. 90p. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo).

BARBOSA, S. F. A. Morbidade na Esquistossomose. Pernambuco, 1965. 180p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina - Universidade do Recife).

BARRETO, M. L.; SMITH, D. H.; SLEIGH, A. C. Implications of faecal egg count variation when using the Kato-Katz method to assess *Schistosoma mansoni* infections. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., v.84, p.554-5, 1990.

BELL, D. R. A new method for counting *Schistosoma mansoni* eggs in faeces. Bull WHO, v.29, p.525-30, 1963.

BUNDY, D. A. P.; HALL, A.; MEDLEY, G. F.; SAVIOLI, L. Evaluating measures to control intestinal parasitic infections. Rapp. trimst. statistic. sanit. mond. v. 45, p.168-79, 1992.

CAMILLO-COURA, L. Programa de controle das geohelmintíases no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia, Poços de Caldas, 1999. (Mesa Redonda)

CERQUEIRA, F. L. Coprotest: metodologia confiável para o exame parasitológico de fezes. Laes, v.9, n.51, p.5,9,12, 1988.

CHAIA G.; CHAIA, A. B. Q. A.; MCAULLIFE, J.; KATZ, N.; GASPER, D. Coprological diagnosis of Schistosomiasis: II - Comparative study of quantitative methods. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.10, n.6, p.349-53, 1968.

CHEEVER A. W.; POWERS, K. G. Counting of *Schistosoma mansoni* Eggs in Feces. Comparison of a Filtration Technique and a Dilution Technique. J. Parasit., v.54, n.3, p.632-33, 1968.

CHIEFF, P. P.; MARQUES, R. M.; SIQUEIRA, J. G. V. Avaliação da eficácia do método de Kato-Katz no diagnóstico parasitológico da esquistossomose mansônica. Rev. Inst. Adolfo Lutz, v.41, n.1, p.23-30, 1981.

CLINE, B. L.; RYMZO, W. T.; HIATT, R. A.; KNIGHT, W. B.; BERRIOS-DURAN, L. A. Morbidity from *Schistosoma mansoni* in Puerto Rican

community: a population-based study. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.26, n.1, p.107-17, 1977.

COOK, J. A.; BAKER, S. T.; WARREN, K. S.; JORDAN, P. A controlled study of morbidity of schistosomiasis mansoni in St. Lucian children, based on quantitative egg excretion. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.23, n.4, p.625-33, 1974.

COSTA, M. F. F. L.; ROCHA, R. S.; KATZ, N. Morbidade da esquistossomose e sua relação com a contagem de ovos de *Schistosoma mansoni* em uma zona hiperendêmica do Estado de Minas Gerais. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.27, n.2, p.66-75, 1985.

DE VLAS, S.J.; GRYSEELS, B. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. Parasitol. Today, n.8, p.274-7, 1992.

DE VLAS, S. J.; GRYSEELS, B.; VAN OORTMARSSSEN, G. J.; POLDERMAN, A. M.; HABBEMA, J. D. F. A model for variations in single and repeated egg counts in *Schistosoma mansoni* infections. Parasitology, v.104, p.451-60, 1992.

DIAS, L. C. S.; MARÇAL JR, O.; GLASSER, C. M.; KANAMURA, H. Y.; HOTTA, L. K. Controle da esquistossomose em área de baixa transmissão. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.87, supl.4, p.233-9, 1992.

DOMINGUES, L.; SILVEIRA, M.; VANDERLEI, M. I.; KELNER, S. Possíveis fatores que alteram os resultados da coproscopia quantitativa de ovos de *S. mansoni* pelo método de Kato-Katz. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.22, n. 3, p. 114-7, 1980.

ENGELS, D.; SINZINKAYO, E.; GRYSEELS, B. Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.54, n.4, p.319-24, 1996.

GIAZZI, J.F. Avaliação do método de Kato & Miura: estudo comparativo das modificações propostas a esse método por Borda & Pellegrino e por Katz, Chaves & Pellegrino, em relação ao método de Stoll & Hausheer no diagnóstico quantitativo da ancilostomose. São Paulo, 1982. 32pp. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo).

GIOIA, I. Levantamento eco-parasitológico da população residente na Fazenda Intervales, SP. São Paulo, 1995. 138pp. (Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo).

HALL, A. Quantitative variability of nematoda egg counts in faeces: a study among rural Kenyans. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., v.75, n.5, p.682-7, 1981.

HALL, A. Intestinal helminths of man: the interpretation of egg counts. Parasitology, v.85, p.605-13, 1982.

HALL, A.; ANWAR, K. S.; TOMPKINS, A. M. Intensity of infection with *Ascaris lumbricoides* and its implications for parasite control. Lancet, v.399, p.1253-7, 1992.

HIATT, R. A.; GEBRE-MEDHIN, M. Morbidity from *Schistosoma mansoni* infections: an epidemiologic study based on quantitative analysis of egg excretion in Ethiopian Children. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.26, n.3, p.473-81, 1977.

HOFFMAN W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. Puerto Rico J. Publ. Helth., v.9, p.283-98, 1934.

KATO, K. A correct application of the thick-smear technic with cellophane paper cover. A pamphlet, p.1-9, 1960.

KATZ, N.; CHAIA, G. Coprological Diagnosis of *Schistosomiasis*. I - Evaluation of quantitative techniques. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.10, n.5, p.295-8, 1968.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.14, n.6, p.397-400, 1972.

KATZ, N.; COELHO, P. M. Z.; PELLEGRINO, J. Evaluation of Kato's Quantitative Method Through the Recovery of *Schistosoma mansoni* Eggs Added to Human Feces. J. Parasitol., v.56, n.5, p.1032-3, 1970.

KNIGHT W. B.; HIATT, R. A.; CLINE, B. L.; RITCHIE, L. S. A modification of the formol-ether concentration technique for increased sensitivity in detecting *Schistosoma mansoni* eggs. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.25, n.6, p.818-23, 1976.

MACHADO M. T.; MACHADO, T. M. S.; YOSHIKAE, R. M.; SCHMIDT, A. L. A.; FARIA, R. C. A.; PASCHOALOTTI, M. A.; BARATA, R. C. B.; CHIEFFI, P. P. Ascariasis in the subdistrict of Cavacos, municipality of Alterosa (MG) Brazil: effect of mass treatment with alendazole on the intensity of infection. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.38, n.4, p. 265-71, 1996.

MANGINI, A. C. S.; QUADROS, C. M. S.; ZUBA, I. P. R.; FERREIRA, S. C.; FLORIANO, L. D.; BOZZOLI, L. M.; TORRES, D. M. A. G. V. Avaliação do kit

Totaltest comparado com as técnicas de sedimentação espontânea, Rugai e Kato, no exame parasitológico de fezes. Rev. Bras. Anal. Clin., v.31, n.1, p.29-31, 1999.

MARTIN, L. K.; BEAVER, P. C. Evaluation of Kato Thick-Smear Technique for quantitative diagnosis of helminth infections. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.17, n.3, p.382-91, 1968.

MASCIE-TAYLOR, C. G. N.; MUSTAFA, A.; MONTANARI, R. M.; KARIM, R.; AHMED, T.; KARIM, E.; AKHTAR, S. A study of the cost effectiveness of selective health interventions for the control of intestinal parasites in rural Bangladesh. J. Parasitolol., v.85, n.11, p. 6-11, 1999.

MELLO, R.T.; ROCHA, M.O.; COSTA, C.A.; GIOVANNINI, H.R.; MOREIRA, M.C.C.G. Estudo comparativo entre os métodos "Coprotest" e de Hoffman, Pons & Janner no diagnóstico de parasitoses intestinais. Rev. Farm. Bioquim., v.10, n.1/2, p.9-15, 1989.

MOTT, K. E.; CLINE, B. L. Advances in epidemiology survey methodology and techniques in schistosomiasis. Bull. WHO, v.58, n.4, p.639-47, 1980.

MULLER M.; SANCHEZ, R. M.; SUSWILLO, R. R. Evaluation of a sanitation programme using eggs of *Ascaris lumbricoides* in household yard soils as indicators. J. Trop. Med. Hyg. v. 92, p. 10-6. 1989.

OLSEN, A. The proportion of helminth infections in a community in western Kenya which would be treated by mass chemotherapy of schoolchildren. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., v.92, p.144-8. 1998

RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. Bull. U.S. Army Med. Dept., v.8, p.326, 1948.

SCOTT, J. A. Dilution egg counting in comparison with other methods for determining the incidence of *Schistosoma mansoni*. Amer. J. Hyg., v.25, p.546-65, 1937.

SLEIGH, A.; HOFF, R.; MOTT, K.; BARRETO, M.; PAIVA, T. M.; PEDROSA, J. S.; SHERLOCK, I. Comparison of filtration staining (Bell) and thick smear (Kato) for the detection and quantitation of *Schistosoma mansoni* eggs in feces. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., v.76, n.3, p.403-6, 1982.

SCHULZ S.; KROEGER, A. Soil contamination with *Ascaris lumbricoides* eggs as an indicator of environmental hygiene in urban areas of north-east Brazil. J. Trop. Med. Hyg., v. 95, p. 95-103. 1992

STOLL, N. R. Investigations on the control of hookworm disease. XV- An effective method of counting hookworm eggs in feces. Amer. J. Hyg., v.3, p.59-70, 1923.

STOLL, N. R.; HAUSHEER, W. C. Concerning two options in dilution egg counting: small drop and displacement. Amer. J. Hyg., v.6, Suppl, p.134-45, 1926.

TAVARES NETO, J.; FORLEO NETO, E.; PRATA, A. Distribuição de ovos do *Schistosoma mansoni* no bolo fecal. Rev. Baiana Saúde Pública, v.20, n.1/4, p.7-12, 1993.

YOUNG, K. H.; BULLOCK, S. L.; MELVIN, D. M.; SPRUILL, C. L. Ethyl Acetate as a substitute for Diethyl Ether in the Formalin-Ether Sedimentation Technique. J. Clin. Microbiol., v.10, p.852-3, 1979.

APÊNDICE 1

Resultados das leituras de 10 lâminas da quantificação por amostragem de ovos de *A. lumbricoides*, em amostras fecais processadas na padronização do "Coprotest quantitativo".

NÚMERO DE OVOS

AMOSTRA	Campos da lâmina										MÉDIA TOTAL	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	**	***
Aa1*	10	11	7	8	8	8	7	9	8	10	8,6	1901
Aa2	9	8	12	8	8	9	10	11	9	7	9,1	2011
Ab1	7	8	13	8	7	9	9	12	12	9	9,4	2077
Ab2	9	6	12	8	9	9	7	8	9	7	8,4	1856
Ba1	3	2	3	3	2	3	3	2	2	3	2,6	575
Ba2	2	2	2	3	2	2	3	3	2	2	2,3	508
Bb1	2	3	2	3	3	2	2	3	3	3	2,6	575
Bb2	3	3	3	4	2	4	2	2	2	3	2,8	619
Ca1	1	0	0	2	0	0	2	0	0	1	0,6	133
Ca2	1	1	0	0	2	1	2	0	3	2	1,2	265
Cb1	3	0	0	3	0	0	1	2	0	0	0,9	199
Cb2	1	1	0	0	0	0	0	2	0	1	0,5	111
Da1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0,2	44
Da2	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0,4	88
Db1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,1	22
Db2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,2	44

*A,B,C,D: amostras fecais coletadas de quatro pacientes diferentes; a,b: dois kits preparados para cada amostra; 1 e 2: duas alíquotas de 50 µl examinadas para cada kit.

** média dos dez campos

*** total de ovos na lâmina: média x 221 (vide item 2.1.4)

APÊNDICE 2

Resultados da quantificação de ovos de *A. lumbricoides* através do “Coprotest quantitativo” e do método de Kato-Katz, utilizando-se amostras fecais procedentes de indivíduos residentes no município de Bananal, SP.

Número de ordem	Método							
	COPROTEST				KATO-KATZ			
	lâmina 1	lâmina 2	média	OPG	lâmina 1	lâmina 2	média	OPG
1	0	0	0,0	0	4	1	2,5	60
2	1	0	0,5	11	1	3	2,0	48
3	2	0	1,0	22	0	0	0,0	0
4	2	0	1,0	22	2	0	1,0	24
5	14	12	13,0	286	13	10	11,5	276
6	20	18	19,0	418	17	15	16,0	384
7	42	36	39,0	858	124	138	131,0	3144
8	53	46	49,5	1089	158	172	165,0	3960
9	69	59	64,0	1408	88	97	92,5	2220
10	61	72	66,5	1463	138	123	130,5	3132
11	78	65	71,5	1573	220	183	201,5	4836
12	105	132	118,5	2607	305	234	269,5	6468
13	120	130	125,0	2750	137	152	144,5	3468
14	138	145	141,5	3113	217	163	190,0	4560
15	214	235	224,5	4939	514	432	473,0	11352
16	575	597	586,0	12892	1087	902	994,5	23868
17	1017	950	983,5	21636	1232	1356	1294,0	31056
18	1989	1547	1768,0	38896	2544	2143	2343,5	56244
19	2055	1812	1933,5	42537	3045	2808	2926,5	70236
20	2763	2917	2840,0	62480	4694	3395	4044,5	97068

OPG - ovos por grama de fezes: média do número de ovos contados em duas lâminas, multiplicada pelo fator de conversão do respectivo método (“Coprotest quantitativo – fator 22; Kato-Katz – fator 24”)

APÊNDICE 3

Resultados da quantificação de ovos de *T. trichiura* através do Sistema "Coprotest quantitativo" e do método de Kato-Katz, utilizando-se amostras fecais procedentes de indivíduos residentes no município de Bananal, SP.

Número de ordem	Método							
	COPROTEST				KATO-KATZ			
	lâmina 1	lâmina 2	média	OPG	lâmina 1	lâmina 2	média	OPG
1	0	0	0,0	0	1	0	0,5	12
2	0	0	0,0	0	1	0	0,5	12
3	1	0	0,5	11	0	0	0,0	0
4	1	0	0,5	11	0	3	1,5	36
5	1	1	1,0	22	2	4	3,0	72
6	2	1	1,5	33	3	1	2,0	48
7	2	1	1,5	33	3	3	3,0	72
8	1	2	1,5	33	1	5	3,0	72
9	3	0	1,5	33	3	5	4,0	96
10	2	1	1,5	33	5	4	4,5	108
11	1	2	1,5	33	7	6	6,5	156
12	2	2	2,0	44	5	6	5,5	132
13	5	0	2,5	55	3	1	2,0	48
14	2	3	2,5	55	3	2	2,5	60
15	1	4	2,5	55	2	6	4,0	96
16	4	1	2,5	55	5	6	5,5	132
17	3	3	3,0	66	4	5	4,5	108
18	2	4	3,0	66	3	7	5,0	120
19	5	3	4,0	88	5	8	6,5	156
20	6	4	5,0	110	4	1	2,5	60
21	10	3	6,5	143	7	11	9,0	216
22	2	11	6,5	143	10	14	12,0	288
23	12	4	8,0	176	14	12	13,0	312
24	6	10	8,0	176	12	15	13,5	324
25	10	13	11,5	253	10	13	11,5	276
26	24	43	33,5	737	47	66	56,5	1356
27	46	32	39,0	858	53	62	57,5	1380
28	51	42	46,5	1023	70	63	66,5	1596
29	94	70	82,0	1804	102	128	115,0	2760
30	146	68	107,0	2354	152	126	139,0	3336
31	119	102	110,5	2431	123	135	129,0	3096

OPG - ovos por grama de fezes: média do número de ovos contados em duas lâminas, multiplicada pelo fator de conversão do respectivo método ("Coprotest quantitativo – fator 22; Kato-Katz – fator 24)

APÊNDICE 4

Resultados da quantificação de ovos de *S. mansoni* através do Sistema "Coprotest quantitativo" e do método de Kato-Katz, utilizando-se amostras fecais procedentes de indivíduos residentes no município de Bananal, SP.

Número de ordem	Método							
	COPROTEST				KATO-KATZ			
	lâmina 1	lâmina 2	média	OPG	lâmina 1	lâmina 2	média	OPG
1	0	0	0,0	0	1	0	0,5	12
2	0	0	0,0	0	1	1	1,0	24
3	1	0	0,5	11	0	0	0,0	0
4	1	0	0,5	11	1	1	1,0	24
5	1	0	0,5	11	2	1	1,5	36
6	1	0	0,5	11	1	4	2,5	60
7	0	2	1,0	22	0	3	1,5	36
8	4	3	3,5	77	3	2	2,5	60
9	4	5	4,5	99	10	13	11,5	276
10	12	5	8,5	187	9	7	8,0	192
11	11	7	9,0	198	7	11	9,0	216

OPG - ovos por grama de fezes: média do número de ovos contados em duas lâminas, multiplicada pelo fator de conversão do respectivo método ("Coprotest quantitativo – fator 22; Kato-Katz – fator 24)

APÊNDICE 5

Resultados da quantificação de ovos através do "Coprotest quantitativo", em amostras fecais com número decrescente de ovos, obtidas por diluição seriada

ESPÉCIE	SÉRIE	N Ú M E R O D E O V O S					MÉDIA	DP	CV
		l â m i n a s							
		1	2	3	4	5			
<i>A. lumbricoides</i>	A*	3403	3205	3072	2851	2851	3076,3	237,2	7,71
	B	1680	1923	1260	1481	1547	1577,9	245,4	15,55
	C	950	928	751	796	774	839,8	92,5	11,01
	D	332	376	265	332	376	335,9	45,3	13,48
	E	227	254	217	251	218	233,4	17,9	7,67
	F	134	129	129	135	118	129,0	6,7	5,23
	G	58	59	38	57	61	54,6	9,4	17,21
	H	33	29	26	31	29	29,6	2,6	8,81
	I	14	13	13	12	13	13,0	0,7	5,44
	J	4	5	5	6	5	5,0	0,7	14,14
	L	1	2	2	2	1	1,6	0,5	34,23
	M	2	2	1	1	1	1,4	0,5	39,12
	N	2	0	1	2	0	1,0	1,0	100,00
O	1	2	0	0	0	0,6	0,9	149,07	
P	1	0	0	0	1	0,4	0,5	136,93	
Q	0	0	0	1	1	0,4	0,5	136,93	
<i>T. trichiura</i>	A	34	24	19	20	20	23,4	6,2	26,62
	B	12	16	5	5	9	9,4	4,7	50,24
	C	2	5	3	3	2	3	1,2	40,82
	D	1	3	0	5	1	2	2,0	100,00
	E	1	1	2	1	1	1,2	0,4	37,27
	F	0	1	0	1	0	0,4	0,5	136,93
	G	0	0	0	1	0	0,2	0,4	223,61
<i>S. mansoni</i>	A	25	20	17	25	16	20,6	4,3	20,77
	B	8	23	9	11	9	12	6,2	52,04
	C	8	1	1	1	3	2,8	3,0	108,33
	D	2	1	1	2	2	1,6	0,5	34,23
	E	0	3	1	2	1	1,4	1,1	81,44
	F	3	1	1	0	0	1	1,2	122,47
	G	0	0	0	1	0	0,2	0,4	223,61
	H	0	1	0	0	0	0,2	0,4	223,61
	I	0	0	0	0	0	0	-	-
	J	0	0	0	0	0	0	-	-
	L	0	0	0	0	1	0,2	0,4	223,61
M	0	0	0	0	0	0	-	-	
N	1	0	0	0	0	0,2	0,4	223,61	

* Amostras de A a E da espécie *A. lumbricoides*: quantificação de ovos por amostragem (vide item 2.1.4)

APÊNDICE 6

Resultados da quantificação de ovos através do método de Kato-Katz, em amostras fecais com número decrescente de ovos, obtidas por diluição seriada.

ESPÉCIE	SÉRIE	NÚMERO DE OVOS					MÉDIA	DP	CV
		l â m i n a s							
		1	2	3	4	5			
<i>A. Jumbrioides</i>	A*	4263	5086	5170	3966	5095	4716,5	560,0	11,87
	B	2653	2636	2845	2690	2521	2669,5	116,9	4,38
	C	1205	1484	1212	1512	1412	1365,5	147,7	10,82
	D	622	566	488	608	400	536,6	92,6	17,25
	E	347	296	368	470	352	366,5	63,7	17,39
	F	178	129	115	160	112	138,8	29,0	20,90
	G	77	106	100	98	127	101,6	17,9	17,64
	H	39	61	52	39	48	47,8	9,3	19,48
	I	15	20	25	20	21	20,2	3,6	17,64
	J	9	7	10	6	11	8,6	2,1	24,11
<i>T. trichiura</i>	L	6	6	7	4	4	5,4	1,3	24,85
	M	3	2	2	3	3	2,6	0,5	21,07
	N	2	1	1	1	1	1,2	0,4	37,27
	O	1	0	0	2	0	0,6	0,9	149,07
	P	0	2	0	0	0	0,4	0,9	223,61
	Q	0	0	1	0	1	0,4	0,5	136,93
	A	44	33	39	32	31	35,8	5,5	15,48
	B	33	12	11	12	18	17,2	9,3	53,82
	C	9	14	6	14	6	9,8	4,0	41,07
	D	6	2	5	5	5	4,6	1,5	32,97
E	3	3	3	2	1	2,4	0,9	37,27	
<i>S. mansoni</i>	F	2	1	1	1	2	1,4	0,5	39,12
	G	1	1	2	0	1	1	0,7	70,71
	H	0	1	1	0	0	0,4	0,5	136,93
	I	0	1	0	0	0	0,2	0,4	223,61
	A	23	32	22	28	32	27,4	4,8	17,43
	B	8	11	19	8	7	10,6	4,9	46,50
	C	5	5	6	5	5	5,2	0,4	8,60
	D	3	4	3	2	3	3	0,7	23,57
	E	1	2	2	3	2	2	0,7	35,36
	F	2	1	0	1	1	1	0,7	70,71
<i>S. mansoni</i>	G	0	3	0	2	0	1	1,4	141,42
	H	0	2	0	0	0	0,4	0,9	223,61
	I	0	1	0	0	0	0,2	0,4	223,61
	J	1	0	0	0	0	0,2	0,4	223,61
	L	0	0	0	0	2	0,4	0,9	223,61
	M	0	1	0	1	0	0,4	0,5	136,93
	N	0	0	0	0	0	0	-	-
	O	0	0	0	0	0	0	-	-
	P	0	0	0	0	1	0,2	0,4	223,61

* Amostras de A a G da espécie *A. Jumbrioides*: quantificação de ovos por amostragem (vide item 2.1.4)

APÊNDICE 7

Resultados da quantificação de ovos através do método de Stoll & Hausheer em amostras fecais com número decrescente de ovos, obtidas por diluição seriada.

ESPÉCIE	SÉRIE	N Ú M E R O D E O V O S					MÉDIA	DP	CV
		l â m i n a s							
		1	2	3	4	5			
<i>A. lumbricoides</i>	A*	421	587	477	451	473	481,8	62,9	13,05
	B	262	190	252	221	229	230,8	28,2	12,23
	C	159	134	109	144	131	135,4	18,4	13,56
	D	39	51	48	54	44	47,2	5,9	12,48
	E	31	34	33	21	30	29,8	5,2	17,34
	F	13	10	13	17	15	13,6	2,6	19,17
	G	6	7	10	8	7	7,6	1,5	19,95
	H	6	6	5	4	3	4,8	1,3	27,16
	I	3	2	3	2	2	2,4	0,5	22,82
	J	1	2	1	1	1	1,2	0,4	37,27
	L	1	0	1	1	0	0,6	0,5	91,29
	M	1	0	0	0	0	0,2	0,4	223,61
	N	0	0	1	0	0	0,2	0,4	223,61
<i>T. trichiura</i>	A	3	11	11	4	7	7,2	3,8	52,34
	B	1	3	5	3	2	2,8	1,5	52,97
	C	2	1	0	2	1	1,2	0,8	69,72
	D	0	1	1	0	1	0,6	0,5	91,29
	E	1	0	0	0	0	0,2	0,4	223,61
	F	0	0	0	0	0	0	-	-
	G	0	0	0	0	0	0	-	-
	H	0	0	1	0	0	0,2	0,4	223,61
<i>S. mansoni</i>	A	4	4	5	9	5	5,4	2,1	38,40
	B	1	3	3	2	2	2,2	0,8	38,03
	C	0	0	0	0	0	0	-	-
	D	1	0	0	0	0	0,2	0,4	223,61
	E	0	0	0	1	0	0,2	0,4	223,61
	F	0	0	0	1	0	0,2	0,4	223,61
	G	0	0	1	0	0	0,2	0,4	223,61
	H	0	0	0	0	0	0	-	-
	I	0	0	1	0	0	0,2	0,4	223,61

* Amostras de A e B da espécie *A. lumbricoides*: quantificação de ovos por amostragem (vide item 2.1.4)

APÊNDICE 8

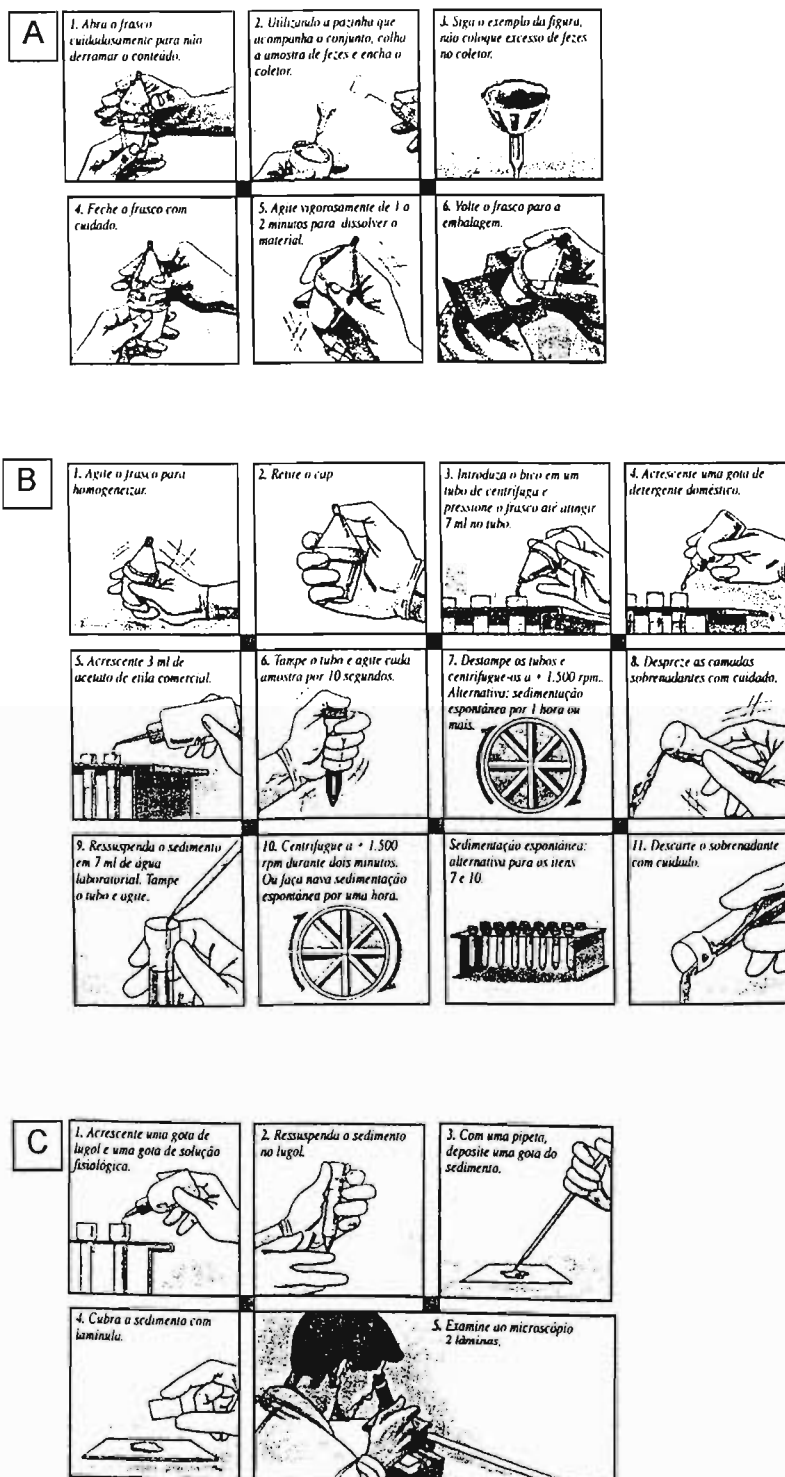
Resultados da quantificação de ovos através do método de Ritchie modificado em amostras fecais com número decrescente de ovos, obtidas por diluição seriada.

ESPÉCIE	SÉRIE	N Ú M E R O D E O V O S					MÉDIA	DP	CV
		l â m i n a s							
		1	2	3	4	5			
<i>A. lumbricoides</i>	A*	3381	4398	3116	4066	3271	3646,5	555,4	15,23
	B	1525	2011	1879	1790	1658	1772,4	189,1	10,67
	C	1282	1017	972	950	1503	1144,8	240,3	20,99
	D	597	464	442	729	530	552,5	115,9	20,98
	E	298	290	290	281	362	304,2	32,9	10,80
	F	135	155	139	126	153	141,6	12,3	8,67
	G	52	64	46	64	72	59,6	10,4	17,50
	H	37	32	33	35	36	34,6	2,1	5,99
	I	15	18	15	17	14	15,8	1,6	10,40
	J	6	6	6	8	5	6,2	1,1	17,67
<i>T. trichiura</i>	L	3	4	3	3	2	3,0	0,7	23,57
	M	4	2	3	2	2	2,6	0,9	34,40
	N	2	1	2	1	0	1,2	0,8	69,72
	O	1	0	2	0	1	0,8	0,8	104,58
	P	1	0	0	0	0	0,2	0,4	223,61
	Q	0	0	0	2	0	0,4	0,9	223,61
	A	52	54	55	57	49	53,4	3,0	5,71
	B	16	15	20	10	8	13,8	4,8	34,90
	C	4	6	7	7	6	6	1,2	20,41
	D	6	2	4	3	2	3,4	1,7	49,22
E	1	1	2	2	2	1,6	0,5	34,23	
F	1	2	0	1	1	1	0,7	70,71	
G	1	0	1	1	0	0,6	0,5	91,29	
H	0	0	1	0	1	0,4	0,5	136,93	
I	0	0	0	0	0	0	-	-	
J	0	0	1	0	0	0,2	0,4	223,61	
L	0	0	0	0	0	0	-	-	
M	0	0	0	0	1	0,2	0,4	223,61	
<i>S. mansoni</i>	A	24	27	15	21	23	22	4,5	20,33
	B	10	13	9	6	12	10	2,7	27,39
	C	4	4	7	8	4	5,4	1,9	36,10
	D	2	1	4	4	2	2,6	1,3	51,60
	E	1	2	2	2	2	1,8	0,4	24,85
	F	0	2	2	1	0	1	1,0	100,00
	G	1	0	0	0	0	0,2	0,4	223,61
	H	1	0	0	0	0	0,2	0,4	223,61
	I	0	0	0	0	1	0,2	0,4	223,61
	J	0	0	0	0	1	0,2	0,4	223,61

- Amostras de A a E da espécie *A. lumbricoides*: quantificação de ovos por amostragem (vide item 2.1.4)

ANEXO 1

Sistema Coprotest®: A – coleta de amostra; B – processamento de amostras e C – leitura de lâminas.



As Figuras foram extraídas de catálogo informativo do Sistema Integrado Coprotest®