

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

JANCARLO FERREIRA GOMES

**AVALIAÇÃO DE UM NOVO *KIT* (*TF-Test*) NACIONAL
DESTINADO AO DIAGNÓSTICO DE ENTEROPARASITÓSES EM
AMOSTRAS FECAIS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção
do título de Mestre em Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cândido de Souza Dias
Co-Orientador: Profa. Dra. Sumie Hoshino Shimizu

Campinas, S.P.
2004

Campinas, 01 de Dezembro de 2004.

Banca Examinadora

Prof. Dr.
Luiz Cândido de Souza Dias

Assinatura

Prof. Dr.
Luiz Augusto Magalhães

Assinatura

Prof. Dr.
Alessandro Francisco
Talamini do Amarante

Assinatura

Profa. Dra.
Urara Kawazoe

Assinatura

Profa. Dra.
Hermínia Yohko Kanamura

Assinatura



" Está provado que tens no sangue e nas tripas todo um jardim zoológico da pior espécie. É essa bicharia cruel que te faz papudo, feio, molenga, inerte. O Jeca não é assim: está assim".

Monteiro Lobato, 1918.

O escritor Monteiro Lobato, referindo sobre a causadora da indolência do personagem Jeca Tatu, através de sua compreensão, nos concede a natureza dos problemas de nossas endemias rurais, fazendo a descrição do nosso homem do campo não como um indivíduo indolente por natureza, mas sim, na realidade, um parasitado crônico. Este personagem vem a expressar a omissão de nossas autoridades médico-sanitaristas.

A

minha Mãe Maria,

ao meu Pai José e,

ao meu irmão José Filho,

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em especial a Deus nosso senhor, por passar a mim luz, amor e energia em toda a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Cândido de Souza Dias, pela orientação deste trabalho, pela amizade, pelos ensinamentos científicos, aos estímulos constantes e, à Profa. Dra. Sumie Hoshino Shimizu, pela co-orientação deste trabalho, pela amizade, pelos ensinamentos de valores e conceitos de vida.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), bem como, ao Instituto de Biologia (IB), ao Laboratório de Parasitologia do Hospital de Clínicas (HC) e, a todos os membros deste laboratório em especial a Profa. Angela Lauand Teixeira.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo aporte financeiro ao projeto original.

À Profa. Dra. Hermínia Yohko Kanamura, pela amizade, sugestões e críticas.

Às Professoras Doutoras e amigas: Ana Julia Urias dos Santos Araujo, Vera Lucia P. Castilho, Fátima Ap. M. Amâncio Neves e Denise Pereira Leme, pela amizade, pelo apoio e auxílios constantes.

À empresa Immunoassay Indústria e Comércio Ltda., em especial ao Sr. Carlos César Moyano Fernandes, pela colaboração e credibilidade ao projeto *TF-Test*.

À empresa MARMAQ Industrial Ltda., ao amigo diretor Paulo Cesar Bellia, pela colaboração durante todo o tempo em que convivemos.

Ao Prof. Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante e, ao Mestre Giuliano Lumina, pela colaboração e auxílio em melhorias introduzidas no *Kit TF-Test*.

À minha cunhada Helena, aos meus sobrinhos Raphael e Lívia, pela alegria e carinho de nossa convivência.

Enfim, a todos que de alguma forma, colaboraram com este trabalho.

OBSERVAÇÃO

O presente trabalho de dissertação de mestrado é parte de um projeto maior, subsidiado pelo programa FAPESP modalidade PIPE / Inovação Tecnológica, com a participação de uma empresa de pequeno porte, Immunoassay Indústria e Comércio Ltda., de pesquisadores das universidades: Universidade Estadual de Campinas-SP (UNICAMP), Universidade de São Paulo-SP (USP), Universidade Estadual Paulista-SP (UNESP) e, Universidade de Taubaté-SP (UNITAU), além de dois laboratórios do setor privado - Hospital Aliança -BA e Previlab Análises Clínicas -SP.

Partes dos resultados aqui obtidos foram apresentados em congressos e publicados como resumos, artigos completos e, um periódico internacional como segue abaixo:

Resumos:

Hoshino-Shimizu, S.; **Gomes, J.F.**; Dias, L.C.S. & Shimizu, T. - Inovação Tecnológica no Projeto, Desenvolvimento e Produção de *Kit* Diagnóstico. 3º Congresso Brasileiro de Gestão de Desenvolvimento de Produto. Florianópolis (SC), setembro de 2001. Caderno de resumos, p.29.

Hoshino-Shimizu, S.; **Gomes, J.F.**; Dias, L.C.S.; Araújo, A.J.U.S.; Castilho, V.L.P. & Neves, F.A.M.A. - Enteroparasitoses: Inovação Tecnológica do *Kit (TF-Test)* Destinado ao Exame Parasitológico. - São Paulo (SP), setembro de 2002. J. Bras. Patol. Med. Lab., 38(3): 199, 2002.

Hoshino-Shimizu, S.; **Gomes, J.F.**; Dias, L.C.S.; Araújo, A.J.U.S.; Castilho, V.L.P. & Neves, F.A.M.A. - Detecção de Enteroparasitoses em Amostras Fecais Procedentes de Diferentes Localidades do Estado de São Paulo, Utilizando a Técnica de *TF-Test*. XXX Congresso Brasileiro de Análises Clínicas. Rio de Janeiro (RJ), junho de 2003. Rev. Bras. Anal. Clín., 35(2): 46 B, 2003.

Artigo Completo:

Hoshino-Shimizu, S.; **Gomes, J.F.** & Dias, L.C.S. - *Inovação Tecnológica no Projeto, Desenvolvimento e Produção de Kit Diagnóstico*. - Congresso Brasileiro de Gestão de Desenvolvimento de Produto, Florianópolis (SC), setembro de 2001. Publicação de trabalho completo em versão eletrônica(CD-ROM), Ed. Forcellini, F.A.; Ogliari, A.; Silva, J.C.; Dias, A. & Back, N., 2001, 6 pgs.

Periódico Internacional:

Gomes, J.F.; Hoshino-Shimizu,S.; Dias, L.C.S.; Araújo, A.J.U.S.;
Castilho, V.L.P. & Neves, F.A.M.A. - Evaluation of a Novel *Kit (TF-Test)*
for the Diagnosis of Intestinal Parasitic Infections. *J. Clin. Lab. Anal.(EUA)*
2004; 18(2): 132-138.

CONTEÚDO

Resumo	ix
Abstract	x
1. Introdução	01
1.1 Objetivo Geral	06
1.2 Objetivo Específico	07
2. Material e Métodos	08
2.1 Fabricação do <i>Kit TF-Test</i>	08
2.1.1 Descrição do <i>Kit</i> - Conjunto Processador	08
2.1.2 Técnica <i>TF-Test</i>	10
2.2 Laboratórios colaboradores para avaliação do <i>Kit TF-Test</i>	11
2.3 Técnicas parasitológicas convencionais	12
2.4 Avaliação intralaboratorial da técnica de <i>TF-Test</i>	17
2.5 Avaliações interlaboratoriais da técnica de <i>TF-Test</i>	17
2.6 Análise estatística	17
2.7 Controle de qualidade (CQ) e Biossegurança	18
2.8 Questionário para coleta de opinião	19
3 Resultados	22
3.1 Avaliação intralaboratorial do protótipo do <i>Kit TF-Test</i>	22
3.2 Avaliações interlaboratoriais do protótipo do <i>Kit TF-Test</i>	27
3.3 Controle de qualidade dos resultados obtidos	29
3.4 Características do <i>Kit TF-Test</i> para usuários	30
3.5 Aspecto de custo-benefício	30
4 Discussão	40
5 Conclusões	47
6 Apêndice	48
7 Referências Bibliográficas	55
8 Anexo	62

RESUMO

As enteroparasitoses humanas constituem atualmente um dos problemas de saúde pública tanto para países em desenvolvimento como para países desenvolvidos, em virtude do aumento no número de viajantes a regiões endêmicas e principalmente por causa de indivíduos imunocomprometidos.

Devido a aumentar a probabilidade do encontro de organismos pelo exame de amostras múltiplas, pelo menos três exames parasitológicos das fezes são necessários, a fim de obter resultados sensíveis. Desta forma, idealizamos e desenvolvemos um *kit* (*TF-Test*) prático e econômico, agora em vias de ser fabricado em escala industrial, por uma empresa (Immunoassay Ind. Com. Ltda., São Paulo, Brasil). Este *kit* possibilita, em dias alternados, a coleta de três amostras fecais, separadamente, em tubos contendo uma solução preservadora. No laboratório, as três amostras são processadas em uma só etapa, utilizando um conjunto, onde a mistura passa por duplo filtro, e é concentrada por uma centrifugação rápida. O presente trabalho trata sobre avaliações dos protótipos do *kit* realizadas em duas fases, sendo a primeira, intralaboratorial abrangendo um período de seis meses, e a segunda, interlaboratoriais de dois anos. Na primeira fase, a técnica de *TF-Test* foi avaliada no estudo de 30 pacientes com parasitoses intestinais e 30 sem infecção parasitária, obtendo uma sensibilidade de 96,6%, significativamente ($p < 0,05$) maior que as demais técnicas convencionais comerciais (*Coprotest*, *StillQuick* e *Parasep*) ou não (Lutz ou Hoffman, Pons & Janer). Ademais, a técnica em questão apresentou um elevado índice de concordância k (0,920), considerado como *Quase Perfeito*, diferindo das técnicas convencionais. Em vista do potencial uso do protótipo para finalidade diagnóstica, o trabalho teve continuidade na segunda fase, onde os protótipos aprimorados foram avaliados no estudo de 1.244 pacientes em seis diferentes laboratórios de setor público e privado, considerados como sendo de referência ou altamente conceituados. Os dados obtidos demonstram que a técnica de *TF-Test* é de fato melhor que as técnicas convencionais utilizadas (*Coprotest*, Lutz e associação de Lutz, Faust & Cols. e Rugai, Mattos & Brisola), por apresentar sensibilidades que variam de 82,6% a 100%, estatisticamente maiores ($p < 0,05$) que as técnicas convencionais. Em quatro laboratórios, o índice k de *TF-Test* teve a classificação de *Quase Perfeito* e em dois laboratórios, *Substancial*. A alta sensibilidade e os aspectos econômicos e práticos demonstram que a técnica de *TF-Test* é apropriada para diagnóstico individual, inquéritos populacionais, assim como, para avaliação de quimioterapia instituída em programas de controle das parasitoses intestinais.

ABSTRACT

Human intestinal parasitoses constitute a serious public health problem either in developing or developed countries. Those enteroparasitoses could be attributed to the increase of travelers around endemic areas and mainly due to immunocompromised patients.

In order to obtain sensible results and to have a high chance to find organisms by multiple sample exams, it is necessary at least three serial parasitological faecal tests. For these reasons, a practice and non-expensive *kit* (*TF-Test*) was developed for being industrialized by a specialized company (Immunoassay Ind. Com. Ltda., Sao Paulo, Brazil). This *kit* makes possible to carry out three different faecal samples each other day. The three faecal samples are separately collected into tubes containing a preservative solution. Laboratory evaluation is done in just one step by using a pool of the three faecal samples. Mixture mass is passing by a double filter and then centrifuged for concentrating the mixture. Thus, the present study reports about evaluations of a prototype *kit* developed into two different phases: first phase was a six months stage inside developer laboratory and, the second one was a two years stage involving six different collaborative laboratories. In the first phase, parasitological exams using *TF-Test* was carried out in 30 patients with intestinal parasites and in 30 patients free of intestinal parasites and, it was significantly more sensible (96,6%, $p < 0,05$) compared with conventional techniques as *Coprotest*, *StillQuick* e *Parasep* or with those frequently used as Lutz or Hoffman, Pons & Janer. Furthermore, *TF-Test* had a high agreement *k* index (0,920), which was considered as *Almost Perfect*, in addition to differ from conventional techniques. Thus, focusing in the potential use of *TF-Test* for diagnosing different intestinal parasites, this work had been continued for developing a better prototype *kit* of *TF-Test*. In the second phase, six different specialized laboratories from public or private service had evaluated faecal samples collected from 1.244 patients. Data from those laboratories attested that *TF-Test* was actually better than other known techniques (*Coprotest*, Lutz and Lutz, Faust & Cols. and Rugai, Mattos & Brisola), for presenting sensibility range between 82,6% and 100%, which was significantly higher than conventional methods ($p < 0,05$). In four of the six laboratories, *k* index of *TF-Test* was classified as *Almost Perfect*, and in the other two laboratories, the index was considered as *Substantial*. The high sensibility of *TF-Test* in addition to its practice and economic aspects shown that *TF-Test* method is very appropriated for individual diagnosis, population inquires as well as for evaluating therapy programs in the control of intestinal parasitoses.

1. INTRODUÇÃO

As enteroparasitoses humanas de importância médica são causadas por microrganismos com variada morfologia e dimensão, pertencentes a pelo menos vinte e três espécies patogênicas diferentes (Garcia, 2001), podendo ser unicelulares, como por exemplo, *Cryptosporidium* spp., bem como multicelulares com estruturas de maior complexidade, como *Taenia saginata*.

As parasitoses intestinais no homem são ainda altamente prevalentes no mundo, principalmente em regiões tropicais (Rey, 2002). Dados divulgados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que cerca de 3,5 bilhões de pessoas no mundo encontram-se infectadas com parasitos intestinais (Garcia, 2001), das quais 450 milhões estão doentes, sendo na maioria crianças vivendo em áreas tropicais e em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. Estima-se que algumas enteroparasitoses como a amebíase ocorra em 10% da população mundial, com mortalidade anual entre 40.000 e 110.000 pessoas. Outrossim, estima-se que *Ascaris lumbricoides* parasite 250 milhões de indivíduos, sendo responsável por cerca de 20.000 óbitos anuais; os ancilostomatídeos aproximadamente 151 milhões de pessoas; *Trichuris trichiura*, 45,5 milhões de indivíduos; e *Giardia intestinalis* perfaça uma incidência mundial da ordem de 500.000 casos por ano. A estimativa para infecções causadas por *Schistosoma mansoni*, por sua vez, é de cerca de 200 milhões de indivíduos acometidos, conduzindo a óbitos anuais de 500.000 mil a 1 milhão dos mesmos. Admite-se que no Brasil haja mais de seis milhões de portadores dessa infecção (Rey, 2002; Neves, 2001).

As coccidíases intestinais, após a década de 80, principalmente com o advento da pandemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS), vêm se destacando pela sua relevância na parasitologia humana. Estima-se que a criptosporidiose afete atualmente indivíduos de mais de 90 países e seis continentes (Fayer, 2000). A criptosporidíase é uma antroponose e, portanto, é de interesse tanto da patologia humana como animal. Há ainda outras infecções humanas, embora pouco prevalentes, ocasionadas por esporozoários pertencentes ao grupo de coccídios intestinais, tais como, *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli*, microsporídios intestinais etc., que são também incluídas no rol das enteroparasitoses de importância médica.

No nosso país, há estimativa de que aproximadamente 51% da população brasileira se encontre infectada com pelo menos uma espécie de parasito intestinal (IBGE, 2002; DATASUS, 2002; OPAS, 2000).

Dados recentes do Instituto Brasileiro de Geografia Estatística e Sistema Único de Saúde (2002) demonstram que no Brasil são realizados em média dezenove milhões de exames parasitológicos de fezes, por ano, nos laboratórios de diagnósticos do setor público.

Nos países desenvolvidos, a transmissão de muitas parasitoses foi interrompida ou reduzida a níveis insignificantes, porém, o mesmo fato não ocorreu naqueles países em fase de desenvolvimento.

Rogers (1988), revendo informações disponíveis sobre a prevalência e o número de casos estimados de pacientes para diferentes tipos de infecções parasitárias, constatou que, na maioria dos países, houve apenas ligeira redução nas taxas de prevalência e que o número absoluto de casos aumentou consideravelmente e com frequência, quando se compararam seus dados em relação aos publicados por Stoll (1947). O crescimento populacional nas últimas décadas em países tropicais, aliados ao aumento da densidade demográfica, e sem melhoria das condições gerais de vida, ocasionaram o aumento da transmissão de doenças parasitárias (Rey, 2002).

O crescimento do número de viajantes pelo mundo nas últimas décadas, estreitou a barreira de tempo colocada entre os países desenvolvidos e os em desenvolvimento. O incremento no número de viagens realizadas aos países tropicais disseminou as infecções parasitárias, as quais no passado recente eram caracterizadas como sendo doenças exóticas. Ademais, com o advento de doenças oportunistas, principalmente devido à pandemia da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), as infecções parasitárias intestinais aumentaram significativamente, principalmente nos países em desenvolvimento (Rispel et al., 1993).

Assim, o diagnóstico laboratorial de parasitoses intestinais, tornou-se recomendação médica frequente, constituindo um dos procedimentos convenientes para controle da transmissão das mesmas, mediante o tratamento de infectados, no atendimento de rotina diagnóstica populacional. Desta forma, em consequência dessa prática, tornou-se patente quanto à necessidade premente de dispor de técnicas parasitológicas de alta eficiência diagnóstica para enteroparasitoses (De Carli, 2001).

Presume-se então que no Brasil, as prevalências de infecções causadas por protozoários e helmintos intestinais sejam de fato mais elevadas e, desta maneira, justificam o desenvolvimento de técnicas diagnósticas eficientes, a fim de contribuir de forma decisiva e acertada nos programas de controle de enteroparasitoses, que constam como sendo um dos problemas de saúde pública nacional.

Estima-se atualmente que aproximadamente 88 milhões de pessoas estejam infectadas por uma espécie de parasito intestinal no país, equivalendo

a quase 51% da população brasileira, se tomar como base o dado já anteriormente exposto (SUS, 2002; OPAS, 2000).

Outrossim, o uso de medicamentos antiparasitários de forma empírica é uma prática pouco recomendável em virtude do fato de que estes não constituem panacéia para as parasitoses em geral, e considerando que os procedimentos diagnósticos são na sua maioria simples e baratos (Chieffi, 2000).

O estabelecimento da etiologia de uma infecção parasitária na sua fase aguda ou crônica é quase sempre difícil e complexo, quando embasado apenas em achados clínicos isolados. Pois, o diagnóstico definitivo é impossibilitado, muitas vezes, pela ausência de sintomatologia ou, se presente, é inespecífica, podendo ser confundida com outras patologias. Desta forma, o diagnóstico médico deverá fundamentar-se nos dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais.

No entanto, há circunstâncias em que o exame laboratorial é considerado como sendo de relevância primordial, notadamente quando é possível a demonstração direta do agente causador da infecção em material clínico como, por exemplo, parasitos, bactérias ou vírus, ou então, quando os achados patognomônicos são evidentes, por exemplo, em caso típico de sarampo ou rubéola, permitindo desta maneira o fornecimento de diagnóstico verdadeiro. Por outro lado, as técnicas sofisticadas como as imunológicas ou moleculares por apresentarem resultados com bases em evidências indiretas, ou seja, interpretados em termos de probabilidade, encontram-se impossibilitadas de resolverem a questão de resultados falsos negativos e principalmente de falsos positivos (Galen & Gambino, 1975).

Atualmente, as técnicas parasitológicas utilizadas para exame de fezes convencionais para diagnóstico populacional, embora sejam de baixo custo, apresentam sensibilidades baixas, quando comparadas com as técnicas acima mencionadas, imunológicas ou moleculares, notadamente quando se tratam de infecções causadas por helmintos e protozoários intestinais, em populações cujo nível de intensidade de infecção é moderado ou baixo.

Vale ressaltar que, em consequência de diferentes fatores, a intensidade de infecção por enteroparasitos em áreas endêmicas são atualmente moderadas ou baixas, diferindo das intensidades altas observadas nas três ou quatro décadas anteriores. Fatores tais como melhorias das condições sanitárias nos municípios, de alimentação, de higiene da população em geral e, da eficiência dos medicamentos utilizados para o tratamento das enteroparasitoses, contribuíram para que a intensidade de parasitismo fosse reduzida tanto em áreas urbanas como rurais.

Nas enteroparasitoses com níveis altos de intensidade de infecção, as técnicas convencionais de diagnóstico laboratorial exigem apenas uma coleta de material fecal e fornecem resultados considerados sensíveis. Todavia, os estudos recentes demonstram que essas mesmas técnicas falham, deixando de detectar parasitos, quando as intensidades de infecção são moderadas ou baixas (Hiatt et al., 1995). Desta forma, determinaram-se que três coletas de material fecal são necessárias para se obter resultados sensíveis (Nazer et al., 1993) para infecções baixas e moderadas, e observou-se também que mesmo para infecções consideradas altas, necessitam de duas coletas de fezes (Catwright, 1999 e Hanson & Catwright, 2001).

A falha na detecção de parasitos, quando se faz coleta única de fezes, é explicada pelo fato de que somente um terço à metade das espécies presentes na massa fecal são revelados. Ademais, a possibilidade de encontrar organismos aumenta pelo exame de amostras múltiplas, em razão da intermitência da passagem de certos parasitos a partir do hospedeiro, da distribuição não uniforme dos ovos dos helmintos no bolo fecal, dos estágios dos protozoários e das limitações das técnicas laboratoriais de diagnóstico (De Carli, 2001; Garcia, 2001).

Existem diferentes técnicas empregadas na rotina de diagnóstico das infecções parasitárias, sendo que algumas destas exigem parasitos mantidos a fresco e em outras pode-se conservar os parasitos em soluções preservadoras. As técnicas mais empregadas utilizando ou não soluções preservadoras, serão aqui comentadas.

A técnica de Lutz ou de Hoffman, Pons & Janer, por exemplo, apesar de ser a mais utilizada entre nós, tem a desvantagem de apresentar grande quantidade de detritos fecais no sedimento final a ser analisado. Estes detritos decorrem do procedimento técnico de filtração, o que dificulta com frequência a visualização de parasitos na lâmina, podendo fornecer resultados falso-negativos para o diagnóstico de protozoários intestinais (De Carli, 2001; Garcia, 2001).

Esta técnica é recomendável para o diagnóstico de helmintos intestinais, pois na íntegra a sedimentação espontânea mantém a estrutura morfológica desses organismos. Outrossim, a técnica de Lutz não é recomendável para o diagnóstico parasitológico da infecção por protozoário, *Blastocystis hominis*, pelo fato de processar fezes frescas lavadas em água corrente sem fixação, provocando lise e desaparecimento deste organismo da lâmina, fornecendo resultado falso-negativo (De Carli, 2001).

A técnica de Faust & Cols. por sua vez é mais indicada para a identificação de cistos de protozoários, de ovos leves e de larvas de helmintos (Amato Neto

& Correa, 1991). Porém para a detecção de ovos grandes de trematódeos, de cestóides ou ovos inférteis de *Ascaris lumbricoides*, esta técnica é imprópria (De Carli, 2001; Faust, 1939).

As técnicas de Rugai, Mattos & Brisola e de Baermann-Moraes fundamentam-se no termohidrotropismo positivo de larvas de nematóides, e são bastante sensíveis, mas sendo apropriadas apenas para larvas de helmintos (Rey, 2002; Neves, 2001; Pessôa, 1982).

A técnica de Kato-Katz, que é quantitativa, presta-se para a identificação de ovos de helmintos nas fezes principalmente de *Schistosoma mansoni*, entretanto, não é indicada para a detecção de larvas de helmintos e protozoários intestinais (Rey, 2002 ; De Carli, 2001 ; Katz, 1970).

No Brasil, existe um *Kit* comercial, *Coprotest*, que processa uma amostra única de fezes coletada em líquido preservador, possibilitando a identificação satisfatória de cistos de protozoários e de ovos e larvas de helmintos intestinais (Dias, 1997; Dias, 1998). Todavia, dependendo do estágio parasitário, oscilações diárias e picos cíclicos que ocorrem na eliminação de parasitos intestinais pelas fezes, associados ao grau de parasitismo com moderada ou baixa intensidade de infecção na população, este *Kit* perde em sensibilidade, quando comparado com técnicas mais sensíveis (Hoshino-Shimizu, 2001; Hoshino-Shimizu, 2002; Hoshino-Shimizu, 2003).

Recentemente, trabalhos realizados com esse *Kit* comercial permitiram a padronização de uma metodologia de quantificação de ovos de helmintos nas fezes. A técnica de *Coprotest* quantitativo mostrou resultados comparáveis ao método de Kato-Katz, quando a intensidade de infecção por *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *Schistosoma mansoni* apresentou-se alta ou moderada (Araujo, 2000). Entretanto, elevado coeficiente de variação foi observado em amostras com reduzido número de ovos, podendo explicar a ocorrência de resultados discordantes desfavoráveis para a técnica de *Coprotest* em relação à de Kato-Katz em amostras de indivíduos com baixa intensidade de infecção (Araujo, 2000).

Vale ressaltar, que mesmo sendo uma técnica de concentração das formas parasitárias, a técnica de *Coprotest* não deve ser utilizada isoladamente na rotina laboratorial, notadamente na vigência de baixa intensidade de infecção (Mendes, 2002).

Na tentativa de aumentar a sensibilidade das técnicas parasitológicas, alguns autores (Aldeen et al., 1993) processaram três amostras fecais coletadas em soluções preservadoras, misturando-as e processando-as como se constituíssem uma única amostra fecal, e encontraram maior sensibilidade.

Há ainda os *Kits* internacionais atualmente como, *StillQuick* (França) e *Parasep* (Inglaterra), utilizados como concentradores de formas parasitárias, e

estes apresentaram um grau de eficiência diagnóstica semelhante ao do *Coprotest* (Shimizu, 2001). Contudo, os *Kits* internacionais por serem importados tornam-se sempre onerosos e de difícil aquisição.

Em vista do exposto, tornou-se evidente a carência de técnica ou *Kit* nacional que tenha bom desempenho diagnóstico, com características de alta sensibilidade, reprodutibilidade, praticidade e de baixo custo.

Desta forma, idealizamos, projetamos, desenvolvemos, padronizamos o processo de fabricação de protótipo de um *Kit* diagnóstico denominado *TF-Test* e, otimizamos as condições de seu uso para o diagnóstico de enteroparasitoses humanas, procurando introduzir inovação no exame parasitológico das fezes, com qualidades desejadas acima referidas de alta eficiência, de manuseio simples e prático e de custo baixo. O trabalho foi realizado em conjunto com um grupo de pesquisadores das universidades do Estado de São Paulo, e com a participação de uma empresa nacional de pequeno porte, tendo o aporte da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Assim, o presente trabalho, para a defesa de Dissertação de Mestrado, constitui uma parte do referido projeto e trata sobre o estudo da técnica de *TF-Test*, utilizando o protótipo do *Kit* desenvolvido na indústria, onde efetuamos avaliações criteriosas, intra e interlaboratoriais. Os dados que obtivemos serão de valia não só para caracterizar melhor o desempenho diagnóstico da técnica de *TF-Test*, mas também, para fornecer bases que assegurem sua posterior fabricação na indústria, comercialização e orientação de laboratórios diagnósticos, usuários do produto.

1.1 Objetivo Geral

Efetuar avaliações, intra e interlaboratoriais, do protótipo do novo *Kit TF-Test* para o diagnóstico de enteroparasitoses humanas, quanto aos aspectos do manuseio e desempenho diagnóstico. Estes achados permitirão introduzir melhorias, definindo a qualidade do *Kit*, para sua posterior industrialização e comercialização, tornando-o disponível aos laboratórios diagnósticos do país.

1.2 Objetivos Específicos

- a) Na primeira fase do trabalho, o protótipo do *Kit TF-Test* foi avaliado quanto à sua funcionalidade e eficiência em realizar diagnóstico de enteroparasitoses em amostras fecais, no laboratório de referência principal. Pretendeu-se nesta fase averiguar o potencial de sua aplicabilidade, assim como, fornecer subsídios para introdução de melhorias na fase posterior de industrialização.
- b) A segunda fase, consistiu de duas etapas, sendo a primeira etapa pertinente a treinamentos de atendentes ou de pessoal responsável para orientação técnica de pacientes para coleta adequada de amostras fecais, assim como, treinar profissionais de laboratório para a utilização deste *Kit*, em virtude de suas características operacionais serem diferentes das demais técnicas convencionais. Na segunda etapa, avaliações mais amplas do *Kit TF-Test* foram efetuadas, em diferentes laboratórios, em paralelo com as técnicas convencionais, considerando diferentes níveis de intensidade de infecção. A finalidade foi de investigar a confiabilidade da técnica de *TF-Test*, em termos de parâmetros diagnósticos de sensibilidade, especificidade, eficiência diagnóstica, além de determinar seus aspectos práticos e econômicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fabricação do *Kit TF-Test*

O *kit TF-Test* foi concebido, desenvolvido e o desenho industrial efetuado para a fabricação do seu protótipo, mediante a confecção de um molde de aço de baixa dureza, mas suficiente para produção de até 1.500 protótipos do *kit*, destinados para estudo de avaliação intralaboratorial, na primeira fase do trabalho. Este protótipo sofreu inúmeras modificações para melhorar os aspectos de sua funcionalidade, referente à facilidade de manuseio, vazamento de material fecal durante a coleta de amostra ou no processamento de mostras no laboratório, e influências diversas de temperatura, transporte, etc.

Para a segunda fase do trabalho, foi confeccionado um novo molde aço, cuja dureza era maior que a do molde anterior, para suportar fabricação do protótipo melhorado do *kit* em escala semi-industrial, mais de 50.000 *kits*. Nesta fase, a indústria proveu os laboratórios diagnósticos participantes com número suficiente de protótipos para serem usados na realização de treinamentos e avaliações deste protótipo, empregando-se um número estatisticamente significativo de amostras fecais.

Após as avaliações pretendidas no presente trabalho, houve um terceiro molde de aço, muito mais resistente, para fabricação do *kit* definitivo em escala industrial e prover os laboratórios do país, comercialmente.

2.1.1 Descrição do *Kit* - conjunto processador de amostras fecais

O *Kit TF-Test* é um sistema, ou conjunto, fabricado em plástico potencialmente reciclável, constituído de diferentes partes conectadas entre si.

Há três tubos coletores-usuário, cada qual contendo líquido preservador (5 mL) para armazenar amostras fecais. A tampa foi desenvolvida para favorecer abertura fácil do tubo, mas ao mesmo tempo, efetuar um fechamento hermético, por meio de clique e batoque, evitando eventual vazamento de líquido ou gás.

Conectada internamente à tampa, há uma peça plástica em forma de pá, para conter um volume aproximado de até 1 mL, correspondendo a 1,2 gramas, de material fecal coletado.

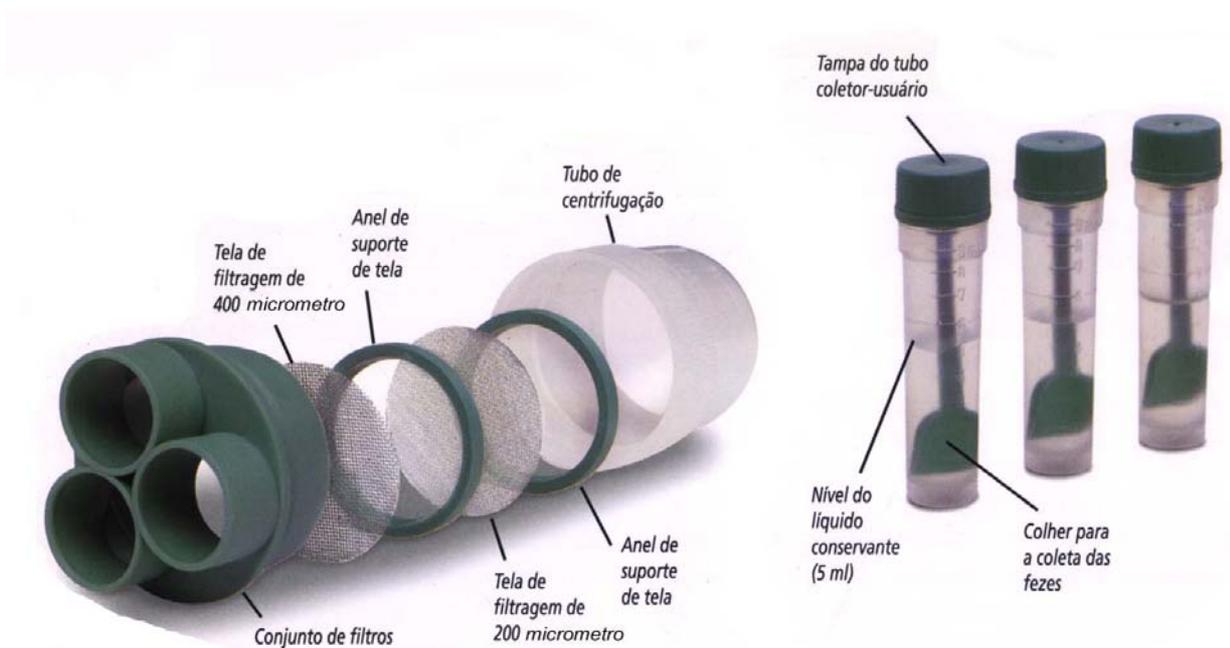
Externamente, o tubo coletor-usuário apresenta graduações desde 1 mL até 10 mL. Existe ainda em destaque uma faixa de segurança, indicando que o

material fecal, quando introduzido no líquido preservador, não deverá ultrapassar o nível de 6 mL.

Abaixo do nível de 6 mL, há um nível inferior da faixa que corresponde à graduação de 5 mL, onde nivela o conteúdo do líquido preservador envazado, que é uma solução neutra de formaldeído. A borda superior da faixa está no nível de 6 mL que é o indicador do limite máximo de tolerância que pode ser atingido pelo líquido preservador, quando o material fecal for adicionado ao tubo.

Os três tubos coletores-usuário são fornecidos aos pacientes para coleta de material fecal, e estes estão acondicionados em uma embalagem plástica com zíper, denominada de *Kit* paciente. Anexada a uma das faces da embalagem plástica, há uma bula explicativa para realizar a coleta de amostra, para facilitar tanto os orientadores de pacientes no balcão de laboratório, como também, o próprio paciente em sua casa. No laboratório, os três tubos coletores-usuário são acoplados, por meio de clique e batoque, a três orifícios de um sistema duplo de filtros, tendo malhas de 400 e 200 micrometros. Este sistema de filtros por sua vez acopla-se também por clique e batoque a um tubo de centrifuga, apresentando um fundo em forma de cone, para o assentamento adequado do sedimento fecal após o processamento de fezes.

Em resumo, o conjunto processador *TF-Test* é constituído por montagem de três tubos coletores-usuário, conjunto de filtros e tubo de centrifugação como segue abaixo.



2.1.2. Técnica de *TF-Test*

O material fecal foi coletado e processado no *Kit TF-Test*, seguindo o protocolo abaixo (conforme Anexo):

- a) Orientar o paciente para coletar somente uma pazinha de fezes (acoplada a tampa do tubo coletor-usuário), de acordo com a instrução que se encontra na embalagem, contendo três tubos coletores-usuários, em dias alternados, e em um período de tempo não ultrapasse a 10 dias;
- b) No laboratório, agitar vigorosamente os tubos coletores-usuário contendo amostras fecais do paciente, homogeneizando-as para serem processadas;
- c) Em uma estante apropriada para o *Kit TF-Test*, acomodar os três tubos pertencentes a cada paciente, em separado, com as tampas semi-abertas. Em seguida, adicionar uma gota (50 μ l) de solvente orgânico, detergente neutro incolor, e 3 mL de acetato de etila p.a. em cada um dos tubos;
- d) Fechar os tubos com as tampas, e com o auxílio de uma régua homogeneizadora, agitar vigorosamente os tubos, já inseridos na estante apropriada *TF-Test*, a fim de obter uma suspensão homogênea de partículas fecais;
- e) Retirar as tampas dos tubos, descartando-as em um recipiente apropriado para descarte de material sólido contaminante, seguindo normas de biossegurança;
- f) Encaixar os três tubos ao conjunto de filtros já com o tubo de centrifuga acoplado;
- g) Verificar se o conjunto processador *TF-Test*, uma vez montado, não apresenta nenhum vazamento do material a ser processado, fazendo-se a inversão do conjunto.
- h) Centrifugar o conjunto processador invertido, por um minuto a 500 g, tendo os três tubos na parte superior e o tubo de centrifuga na parte inferior, em uma caçapa de 100 mL universal;
- i) Após a centrifugação, desacoplar cuidadosamente o tubo de centrifuga, colocando-a na estante *TF-Test*, e descartar o resto do conjunto de filtros e tubos em recipiente apropriado para material sólido contaminante, como acima referido;
- j) Decantar o líquido sobrenadante do tubo de centrifuga, colocando-o em um recipiente apropriado para descarte de material líquido contaminante, também conforme as normas de biossegurança;
- k) Adicionar cerca de 10 gotas de solução salina fisiológica (NaCl a 0,85%) sobre o sedimento formado no fundo do tubo de centrifuga,

- ressuspendendo-o e homogeneizando-o delicadamente com uma pipeta plástica descartável e individual para cada amostra de paciente;
- l) Utilizando a mesma pipeta, colocar uma gota (50 µl) do material processado e homogeneizado sobre uma lâmina de microscopia;
 - m) Acrescentar, sobre a gota acima mencionada, uma gota (50 µl) de solução de iodo de lugol diluído a 2%, e mais uma gota (50 µl) de solução salina fisiológica. Preparar em seguida esfregaço do material diluído sobre a lâmina;
 - n) Cobrir o esfregaço com lamínula, e examiná-lo em microscopia de luz convencional com aumentos de 100 e 400 vezes;
 - o) Terminado a leitura na microscopia de luz, descartar o tubo de centrífuga com o resto da suspensão de material fecal em um recipiente apropriado para material sólido contaminante, como já referido anteriormente.

2.2 Laboratórios colaboradores para avaliação do *Kit TF-Test*

Um total de seis laboratórios, considerados como conceituados, sendo quatro pertencentes a universidades e dois do setor privado, participou da avaliação interlaboratorial do novo *Kit*. Os laboratórios do setor público foram: Laboratório de Parasitologia do Departamento de Biologia da Universidade de Taubaté (UNITAU-SP) (A); Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista (UNESP/Botucatu-SP) (B); Laboratório de Parasitologia, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP-SP) (C); e Laboratório de Parasitologia do Hospital das Clínicas de São Paulo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP-SP) (D). Os dois laboratórios do setor privado pertenciam ao: Hospital Aliança da cidade de Salvador (BA) (E) e Previlab Análises Clínicas da cidade de Piracicaba (SP) (F). Os dois últimos laboratórios do setor público trabalharam com pacientes, tendo alto grau de poliparasitismo; o primeiro laboratório trabalhou com indivíduos de área endêmica para enteroparasitoses, tendo grau médio de poliparasitismo; o segundo laboratório, baixo grau de poliparasitismo; e os dois últimos do setor privado, também baixo grau de poliparasitismo.

2.3 Técnicas parasitológicas convencionais

No presente trabalho, seis técnicas convencionais foram empregadas para poder avaliar o desempenho diagnóstico da técnica do *Kit TF-Test*. Os protocolos para a realização dessas técnicas estão abaixo relacionados, ressaltando que as normas de biossegurança foram sempre praticadas.

2.3.1 Técnica de Lutz (Lutz, 1919) e/ou Técnica de Hoffman, Pons & Janer (Hoffman & cols., 1934)

- a) Coletar a amostra de material fecal sem líquido de preservação (fezes frescas);
- b) Transferir cerca de 2 a 5 g de fezes para copo ou béquer de 250 mL, completar o volume para 50 a 60 mL com água corrente, e misturar vigorosamente com a utilização de espátula de madeira descartável ou bastão de vidro;
- c) Inverter o copo ou béquer com material fecal homogeneizado em um copo cônico de 125 mL, embocado com gaze, levemente umedecida em água corrente, dobrada de duas a quatro vezes, e filtrar a suspensão;
- d) Caso seja necessário, adicionar água corrente até completar aproximadamente 3/4 do volume do copo cônico. Deixar a suspensão em repouso durante no mínimo por 12 horas;
- e) Com a utilização de canudo, pipeta Pasteur ou plástica descartável, coletar de uma a duas gotas do sedimento da camada inferior, e depositar sobre uma lâmina de microscopia. Aplicar sobre a(s) gota(s) do sedimento uma gota de solução iodo de lugol diluído;
- f) Examinar a lâmina em microscópio de luz convencional com aumentos de 100 e 400 vezes.

2.3.2 Técnica de Faust & Cols (Faust & cols, 1939).

- a) Coletar o material fecal em frasco apropriado, sem o líquido preservador (fezes frescas);
- b) Transferir de 1 a 2 g de fezes frescas para um frasco ou béquer, contendo aproximadamente 10 mL de água corrente filtrada. Filtrar a suspensão com a utilização de gaze, levemente umedecida em água corrente, dobrada duas

- vezes, em um tubo de centrifugação de 15 mL com fundo redondo. A suspensão poderá também ser filtrada através de filtro descartável, com alça de segurança, levemente umedecido em água corrente filtrada;
- c) Adicionar água corrente até completar aproximadamente 2/3 da capacidade do tubo de centrífuga;
 - d) Centrifugar a 650 g por um período de 1 minuto. Decantar o sobrenadante em local apropriado, segundo normas de biossegurança, e adicionar de 1 a 2 mL de água corrente ao sedimento restante, e em seguida ressuspenda-o. Completar com água corrente aproximadamente 2/3 do volume do tubo de centrífuga, agitar e centrifugar novamente;
 - e) Após centrifugação, repetir a etapa "c", até que o sobrenadante apresente-se relativamente claro;
 - f) Após decantação do último sobrenadante, adicionar aproximadamente de 1 a 2 mL do reagente de sulfato de zinco com densidade de 1,18 g/mL e, ressuspender o sedimento. Em seguida, completar com o reagente de sulfato de zinco até 0,5 cm da borda do tubo de centrífuga. Centrifugar a 650 g por um período de 1 minuto;
 - g) Cuidadosamente, remover o tubo da centrífuga e, sem agitação, colocá-lo em uma estante em posição vertical;
 - h) Com o auxílio de uma alça apropriada de arame, com diâmetro que pode variar de 5 a 7 mm, tocar no centro da membrana formada na superfície, e transferir várias alçadas para lâmina de microscopia;
 - i) Examinar a lâmina, em microscópio de luz convencional com aumentos de 100 e 400 vezes.

2.3.4 Técnica de Rugai, Mattos & Brisola (Rugai & cols., 1954)

- a) Coletar o material fecal a fresco, sem o líquido de preservação;
- b) Na abertura do frasco coletor, estender gaze dobrada em duas vezes, e repuxar as extremidades para trás;
- c) Encher um copo cônico de sedimentação para capacidade de 125 mL, com aproximadamente 70 a 100 mL de água corrente aquecida à temperatura de 40-45 °C;
- d) Embocar a abertura do frasco coletor com gaze dobrada para o interior do copo cônico de sedimentação, de modo que o líquido alcance toda a extensão da abertura do frasco, tomando o cuidado para não formar bolhas de ar;

- e) Deixar o copo cônico mais frasco embocado em repouso por um período de 120 minutos;
- f) Coletar o sedimento, no fundo do copo cônico, com pipeta capilar longa e transferir para lâmina de microscopia;
- g) Adicionar ao sedimento da lâmina solução iodo de lugol, fazer esfregão e cobrir material com lamínula;
- h) Examinar a lâmina, em microscópio de luz convencional com aumentos de 100 e 400 vezes.

2.3.5 Técnica de Kato-Katz (kato, K., 1960)

- a) Coletar a amostra fecal sem o líquido de preservação.
- b) Colocar amostra coletada em frasco convencional, sobre papel absorvente;
- c) Comprimir tela metálica de 60 ou 80 malhas/cm³, ou de náilon de 105 malhas/cm³, sobre as fezes, fazendo com que parte das fezes passe através das malhas;
- d) Remover as fezes que passaram através das malhas e transferi-las para um cartão retangular de 3 cm x 4 cm x 1,37 cm com um orifício central de 6mm de diâmetro. As fezes são depositadas no orifício do cartão e colocado sobre a lâmina comum de microscopia;
- e) Após encher o orifício central com fezes, remover com cuidado o cartão, deixando as fezes na lâmina;
- f) Cobrir as fezes com lamínula de papel celofane permeável de espessura média e tamanho de 20 x 26 mm. Em seguida, inverter e pressionar a lâmina sobre o papel absorvente;
- g) Deixar a preparação em repouso, para clarificação, durante aproximadamente 30 minutos à temperatura de 34-40 °C ou à temperatura ambiente por um período de uma a duas horas;
- h) Examinar a preparação em microscopia de luz convencional.
Observação: A lamínula de papel celofane é previamente tratada, por um período mínimo de 24 horas, com solução de verde malaquita em glicerina.

2.3.6 Técnica de Coprotest (NL Com. Ext. Ltda)

- a) Coletar aproximadamente 1,4g de material fecal e homogeneizá-lo em solução de formalina tamponada (10%);

- b) Transportar a amostra fecal preservada para um frasco coletor *Coprotest*;
- c) Retirar o bico removível deste frasco, e transferir 7 mL do material fecal preservado para um tubo de centrifuga de 15 mL, com fundo cônico;
- d) Em seguida, acrescentar uma gota de detergente doméstico e 3 mL de acetato de etila;
- e) Tampar o tubo de centrifuga e agitar manualmente por aproximadamente 10 segundos;
- f) Destampar o tubo e centrifugar a 500 g por um período de 2 minutos;
- g) Desprezar o sobrenadante com cuidado;
- h) Ressuspender o sedimento com 7 mL de água corrente, e tampar o tubo novamente agitando a suspensão manualmente;
- i) Centrifugar novamente nas mesmas condições de tempo e rotação da etapa "h". Descartar o sobrenadante, em um coletor apropriado;
- j) Adicionar uma gota da solução de iodo de lugol (50 µl) e uma gota (50 µl) de solução salina fisiológica ao sedimento aderido no fundo cônico do tubo;
- k) Ressuspender o sedimento do tubo e, através de pipeta descartável ou canudo, transferir uma gota (50 µl) do material ressuspenso à lâmina de microscopia;
- l) Cobrir a suspensão do sedimento depositado na lâmina de microscopia com lamínula;
- m) Examinar o material em microscopia de luz convencional com aumentos de 100 e 400 vezes.

2.3.7 Técnica de *Parasep* (DiaSys Europe Ltd.)

- a) Entregar ao paciente o frasco coletor de 30 mL *Parasep*, contendo 9 mL de solução tamponada de formalina a 10% e, 3 (três) gotas do detergente Triton x-100;
- b) Instruir o paciente para transportar para o frasco coletor *Parasep*, com o auxílio da colher *Parasep*, aproximadamente de 2 a 3g de fezes quando estas forem formadas, ou quando material fecal for diarréico, colocar o equivalente a 5 ou 6g de fezes ;
- c) No laboratório, proceder a homogeneização de material fecal por agitação manual ou através da utilização de homogeneizador (Vortex);
- d) Descartar a tampa mais pá do frasco coletor *Parasep* em um recipiente apropriado para material contaminante, e acoplar o frasco coletor ao

restante do *Kit*, que é composto por um filtro central e tubo de centrífuga;

- e) Inverter o *Kit* até que a amostra fecal seja filtrada e sedimentada naturalmente;
- f) Retirar o tubo de centrífuga do restante do *Kit* e acrescentar 3 mL de acetato de etila na solução com amostra fecal filtrada e sedimentada;
- g) Acoplar novamente o restante do *Kit* ao tubo e centrifugar por 500 g pelo período de 5 minutos;
- h) Após a centrifugação, desprezar o líquido sobrenadante;
- i) Transferir o sedimento para ser examinado em lâmina de microscopia óptica.

2.3.8 Técnica de *StillQuick* (Labo-Moderne)

- a) Introduzir material fecal coletado com auxílio de pá coletora do *Kit* em tubo coletor *StillQuick*, contendo o líquido preservador, consistindo de solução tamponada de formalina 10%;
- b) Acrescentar na suspensão do material fecal, solvente especial (não especificado pelo fabricante) para dissolver material orgânico presente nas fezes. Ainda nesta etapa, acrescentar solução de iodo de lugol concentrado;
- c) Descartar a tampa mais pá coletora de forma semelhante descrita na técnica anterior, e acoplar o tubo coletor ao restante do *Kit*, que é composto por peça central filtrante e tubo de centrifugação;
- d) Agitar o *Kit* acoplado manualmente ou através de homogeneizador Vortex, por um período de 10 segundos. Deixar *Kit* em repouso com tubo de centrífuga voltado para baixo, por um período de 1 a 2 minutos;
- e) Centrifugar o *Kit* a 500 g por um período de 10 minutos;
- f) Desprezar líquido sobrenadante como mencionado anteriormente;
- g) Transferir de 2 a 3 gotas do sedimento para lâmina de microscopia óptica e realizar o exame.

2.4 Avaliação intralaboratorial da técnica de *TF-Test*

O Laboratório de Parasitologia, do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) foi, desde o início, responsável na parte de avaliação do protótipo do *Kit TF-Test*.

Assim para a avaliação do *Kit* na primeira fase do projeto a fim de determinar a potencialidade da sua aplicação em rotina de laboratório diagnóstico, foi preparado um painel de 60 amostras fecais (Hoshino-Shimizu, et.al, 1982), sendo 30 de indivíduos infectados e 30 de indivíduos não infectados, com bases nos achados de exames parasitológicos realizados pela técnica de Lutz. Estas amostras não foram coletadas em três dias alternados, porém, em relação à segunda e terceira amostra, foi efetuada uma contaminação com amostras conhecidas, e os restantes deixando sem a contaminação, a fim de simular as prováveis situações que ocorrem na eliminação de formas parasitárias nas fezes. Nesta avaliação, foram utilizados três conjuntos adquiridos no comércio, sendo dois de procedência estrangeira, *StillQuick* e *Parasep* e um nacional, *Coprotest*, além de uma técnica convencional, a de Lutz. Esta fase abrangeu um período de seis meses.

2.5 Avaliações interlaboratoriais da técnica de *TF-Test*

Um total de 1.244 amostras fecais de pacientes infectados e não infectados por parasitos intestinais foi estudado em seis laboratórios anteriormente referidos, sendo 309 de pacientes, no laboratório A; 300 pacientes, no laboratório B; 238, no C; 256, no D; 125, no E; e 16, no F. Para estas avaliações, a coleta de amostra realizada por pacientes foi trabalhosa, pois, para a técnica de *TF-Test*, três amostras fecais foram coletadas em dias alternados, enquanto que para as demais técnicas convencionais a coleta foi única. Esta fase de trabalho teve a duração de dois anos.

2.6 Análise estatística

Os resultados obtidos na técnica de *TF-Test* foram avaliados em comparação com os resultados das técnicas convencionais. A positividade encontrada, com a combinação de todas as técnicas empregadas em cada laboratório, foi considerada como sendo o dado de referência. A positividade

encontrada por *TF-Test* foi comparada com técnicas convencionais, utilizando o teste estatístico z para proporções (De Mutt, 1999). Para os valores de sensibilidade e especificidade (Galen & Gambino, 1975), intervalos de confiança a nível de 95% foram calculados (Rothman & Boyce, 1982). A eficiência das técnicas empregadas foi determinada em termos de índice *kappa* (*k*) de concordância (Maclure & Willet, 1987), testando a consistência do valor de *k* (Fleiss, 1981), e classificação do *k* de acordo com o seu grau de concordância (Feinstein, 1985), que permite definir como sendo: *ruim*, para valores de *k* variando de 0 a 0,2; *fraca*, de 0,21 a 0,40; *moderada*, de 0,41 a 0,60; *substancial*, de 0,61 a 0,80; e *quase perfeita*, de 0,81 a 1,00.

2.7 Controle de Qualidade (CQ) e Biossegurança

A grande maioria de parasitos intestinais é identificada por exame parasitológico das fezes. Para obter uma identificação segura e criteriosa de um parasito, detalhes morfológicos inalterados são decisivos, os quais são dependentes de uma boa coleta, como também, de uma boa preservação de espécimes fecais. Assim com o objetivo de obter resultados confiáveis, esforçamo-nos em implantar o uso do novo *Kit TF-Test*, mantendo o alto nível nas práticas de laboratório. O monitoramento do trabalho nos diferentes laboratórios colaboradores foi efetuado mediante o emprego de manual preparado pela indústria, onde foram incluídos assuntos pertinentes à: a) orientação de pacientes para coleta de materiais fecais e cuidados para a preservação desses materiais até a sua entrega ao laboratório; e b) etapas de processamento de materiais fecais no laboratório por profissionais e cuidados a serem tomados durante o trabalho; além de realizar reuniões constantes com os responsáveis de laboratórios quanto às dificuldades encontradas no manuseio, detecção de falhas na fabricação do *Kit* ou descobertas outras não previstas anteriormente, trocas de informações quanto aos resultados que vinham sendo obtidos.

Ademais, os dados parciais obtidos em cada um dos laboratórios foram sucessivamente submetidos a um critério nosso de controle de qualidade, com bases no método de diagrama de controle de qualidade (De Muth, 1999), onde o número de parasitos detectados por técnica de *TF-Test* foi comparado com aos de técnicas convencionais, determinando o índice de positividade relativa, fazendo a relação: no. de parasitos detectados por técnica convencional/no. de parasitos detectados por técnica de *TF-Test*. Este índice foi comparado com o índice padrão, com a faixa de variabilidade dada por desvio padrão. Cada um

dos laboratórios foi determinando o índice padrão, possibilitando assim avaliar a reprodutibilidade relativa dos resultados obtidos.

Visando dar maior segurança e proteção durante a parte operacional do exame laboratorial, o *Kit TF-Test* foi desenhado de tal forma que o contato com o material fecal contaminado fosse reduzido ao mínimo possível, eliminando desta forma a ocorrência de eventual contaminação, tanto pelo próprio paciente e equipe técnica dos laboratórios. Ademais durante a realização dos exames com o novo *Kit*, o descarte de materiais fecais, assim como o líquido sobrenadante contendo acetato de etila p.a., foram coletados em recipientes próprios para materiais contaminados, segundo as normas de biossegurança.

2.8 Questionário para coleta de opinião

As opiniões e sugestões proferidas por profissionais de laboratório no tocante ao aspecto de manuseio, processamento de material fecal, economia de tempo e espaço no laboratório, foram sendo registradas durante as referidas reuniões acima referidas.

Folhas contendo perguntas sobre o manuseio, dificuldades e outros assuntos pertinentes, conforme ilustrado no modelo abaixo, foram entregues aos pacientes, a fim de determinar se havia ou não fatores que interferiam na qualidade dos exames que estávamos realizando nos diferentes laboratórios. Há fatores conhecidos que afetam a qualidade dos exames parasitológicos, pois, dependem da maneira como a coleta de material fecal foi efetuada que, por sua vez, associa-se à orientação dada ao paciente, ou ainda, ao procedimento durante o transporte das amostras ao laboratório, e finalmente às boas maneiras dispensadas pelos profissionais de laboratório.

Questionário entregue aos pacientes que participaram do projeto *TF-Test*

Avaliação do paciente usuário do Kit TF-Test

1. A coleta em dias alternados é difícil para você ?

sim não

Comentários:

2. A quantidade de fezes coletada com o auxílio da pazinha é fácil ?

sim não

Comentários:

3. Teve algum problema na abertura e fechamento do frasco coletor de fezes?

sim não

Comentários:

4. O cheiro do líquido utilizado no frasco coletor para conservar as fezes incomoda?

sim não

Comentários:

5. Deixar o material fecal coletado sem colocar na geladeira é bom para você ?

sim não

Comentários:

6. O tamanho e o formato do frasco coletor é fácil de ser carregado para o laboratório ?

sim não

Comentários:

7. Foi difícil entender a maneira e a quantidade de coletar material fecal ?

sim não

Comentários:

8. O líquido conservante ajuda na coleta das fezes ?

sim não

Comentários:

9. Percebeu algum tipo de vazamento do líquido conservante nos tubos de coleta ?

sim não

Comentários:

10. Uma marcação mais forte no tubo coletor, indicando volume a ser coletado, ajuda a sua coleta de fezes ?

sim não

Comentários:

11. As três coletas com líquido conservante melhoram muito o seu diagnóstico. Você concorda que é melhor do que uma única coleta onde o resultado pode ser falho ?

sim não

Comentários:

12. Achou prático o procedimento de coleta do *Kit* coletor *TF-Test* ?

sim não

Comentários:

13. A numeração existente de 6 mL para marcar a coleta correta é suficiente ?

sim não

Comentários:

14. Você tem algum outro comentário

3. RESULTADOS

3.1 Avaliação intralaboratorial do protótipo do *Kit TF-Test*

Na primeira fase do trabalho, o protótipo do *Kit* foi analisado no laboratório principal de referência, tendo em mente a necessidade de compará-lo com outros conjuntos comercializados, além de uma técnica convencional utilizada em rotina de diagnóstico laboratorial. A tabela 1 demonstra que a positividade encontrada para a detecção tanto de helmintos (88,6 %) ou de protozoários (100 %) intestinais, pela técnica de *TF-Test*, foi maior em relação às demais técnicas. Todavia, a positividade de *TF-Test* para estes dois grupos de parasitos não foi significativa ($z_{\text{obtido}} < 1,6$; $p > 0,05$). Se o total de detecções (96,6%) parasitárias for considerado, a positividade obtida por *TF-Test* torna-se estatisticamente significativa ($z_{\text{obtido}} > 2,3$; $p < 0,05$).

A sensibilidade diagnóstica das diferentes técnicas, assim como, os respectivos intervalos de confiança, a nível de 95%, estão apresentados na tabela 2, onde a técnica de *TF-Test* está assinalada como tendo o melhor desempenho diagnóstico ($z_{\text{obtido}} = 3,5$; $p < 0,05$) em relação às demais técnicas. A especificidade encontrada para as diferentes técnicas utilizadas foi de 100%.

A eficiência diagnóstica, expressa em termos de índice k , para cada uma das técnicas empregadas está ilustrada na tabela 3, com a categoria correspondente ao critério estabelecido de classificação. A técnica de *TF-Test* apresentou o maior valor de k , ocupando a categoria de *Quase Perfeito*. Os índices k obtidos foram consistentes, apresentando valores de z maiores que 1,96, sendo portanto significativos ($p < 0,05$).

A influência do poliparasitismo na sensibilidade diagnóstica da técnica de *TF-Test* foi também averiguada. Assim no critério estipulado, analisando um grupo de pacientes com infecção por *Ascaris lumbricoides* com cargas parasitárias abaixo de 100 ovos por grama de fezes (OPG), e o outro grupo com carga parasitária acima de 1000 OPG, a nova técnica não apresentou nenhuma diferença significativa quanto à sua positividade, sendo de 100% para ambos os grupos (tabela 4). Observa-se que a positividade encontrada na técnica de *TF-Test*, de 100%, é significativamente maior ($z_{\text{obtido}} = 2,3$; $p < 0,05$) do que à de Kato-Katz, de 75%.

Apesar de um pequeno número de usuários ter mencionado defeitos como, vazamento e dureza para abertura e fechamento do tubo coletor-usuário, os dados desta primeira fase do projeto foram considerados como sendo promissores, com possibilidade de realizar a posterior industrialização se diversas correções no protótipo do *kit* fossem introduzidas, à medida que os

defeitos fossem assinalados pelos usuários, durante o processamento do material fecal.

Tabela 1. Positividade encontrada por técnica de *TF-Test* e por outras técnicas, disponíveis ou não no comércio, no estudo de trinta amostras fecais de pacientes com parasitoses intestinais, do Hospital de Clínicas, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Parasito	Técnica Parasitológica					
	<i>TF-Test</i> (no. pos.)	<i>Coprotest</i> (no. pos.)	<i>Parasep</i> (no. pos.)	<i>StillQuick</i> (no. pos.)	Lutz (no. pos.)	Todas as téc. (no. pos.)
Helminto						
<i>Strongyloides stercoralis</i>	6	7	6	6	6	7
Ancylostomatidae	6	4	3	6	4	6
<i>Ascaris lumbricoides</i>	6	3	3	4	6	6
<i>Taenia</i> spp.	6	6	6	4	3	6
<i>Hymenolepis nana</i>	4	4	4	4	4	4
<i>Schistosoma mansoni</i>	3	0	0	0	2	3
<i>Trichuris trichiura</i>	0	1	0	3	0	3
	31	25	22	27	25	35
Protozoário						
<i>Endolimax nana</i>	27	27	27	27	27	27
<i>Entamoeba coli</i>	24	23	23	23	23	24
<i>Giardia intestinalis</i> *	16	10	10	10	16	16
<i>Blastocystis hominis</i>	10	10	10	10	0	10
<i>Iodamoeba butschlii</i>	6	6	6	6	6	6
	83	76	76	76	72	83
Total (n)	114	101	98	103	97	118

* - *Giardia intestinalis* (sinonímia: *Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis* e *Lamblia intestinalis*)

Tabela 2. Sensibilidade diagnóstica da técnica de *TF-Test* e das demais técnicas, no estudo de trinta amostras fecais contaminadas com múltiplas formas parasitárias de pacientes do Hospital de Clínicas, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Técnica	Sensibilidade (no. positivos/no. total positivos)	Intervalo de Confiança
<i>TF-Test</i>	96,6 %* (114/118)	92,2 % - 99,4 %
<i>StillQuick</i>	87,3 % (103/118)	79,9 % - 92,2 %
<i>Coprotest</i>	85,6 % (101/118)	78,1 % - 90,8 %
<i>Parasep</i>	83,1 % (98/118)	75,3 % - 88,9 %
Lutz	82,2 % (97/118)	74,2 % - 88,2 %

* $P < 0,05$

Tabela 3. Eficiência diagnóstica, em termos de índice *kappa* (*k*), no estudo de trinta amostras fecais de pacientes do Hospital de Clínicas, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Técnica	Índice <i>k</i> *	Classificação <i>k</i>
<i>TF-Test</i>	0,920	<i>Quase Perfeito</i>
<i>StillQuick</i>	0,736	<i>Substancial</i>
<i>Coprotest</i>	0,707	<i>Substancial</i>
<i>Parasep</i>	0,666	<i>Substancial</i>
Lutz	0,625	<i>Substancial</i>

* $P < 0,05$

Tabela 4. Influência da carga parasitária na positividade nas técnicas de *TF-Test* e de Kato-Katz, no estudo de 20 pacientes infectados com *Ascaris lumbricoides*, do Hospital de Clínicas, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Carga Parasitária	Técnica Parasitológica			
	<i>TF-Test</i>		Kato-Katz	
	Positividade (%)	(n)	Positividade (%)	(n)
OPG ^a				
> 1.000	100	20	100	20
< 100	100*	20	75	15

^a Ovos por grama de fezes; * $P < 0,05$

3.2 Avaliações interlaboratoriais do protótipo do Kit *TF-Test*

A técnica de *TF-Test*, utilizando o protótipo do *kit*, foi avaliada comparativamente com diferentes técnicas parasitológicas convencionais empregadas na rotina diagnóstica de seis laboratórios colaboradores do país.

A tabela 5 fornece os dados gerais obtidos no estudo de 1.244 indivíduos, apresentando o número total de indivíduos com infecções intestinais (467) e por cada uma das técnicas empregadas em diferentes laboratórios; tipos de infecção (simples, dupla, tripla ou múltipla); e total do número de infecções (832) detectadas por todas as técnicas e laboratórios. A positividade encontrada com a técnica de *TF-Test*, tanto em indivíduos infectados como em total de infecções, foi sempre maior que a das demais técnicas.

A técnica de *TF-Test*, assim como, as demais técnicas apresentaram especificidades de 100%, no estudo efetuado em 777 indivíduos sem nenhuma infecção, ou seja, 62,5% dos 1.244 indivíduos estudados. As sensibilidades variaram conforme o laboratório, como mostra a tabela 6, porém, a técnica de *TF-Test* forneceu maior sensibilidade quando comparada com as demais técnicas convencionais, sendo estatisticamente significativo ($z_{obtidos} > 2,0$; $p < 0,05$) em laboratórios onde se processaram grande número de amostras fecais positivas, ou seja, mais de 102 amostras. Nos três laboratórios onde esse número foi pequeno, menos de 43, os achados não foram significativos.

Todavia se o critério for o de considerarmos o poliparasitismo com grau alto, médio e baixo, a técnica de *TF-Test* apresentou as sensibilidades significativamente ($z_{obtidos} > 2,7$; $p < 0,05$) mais elevadas em diferentes graus de infecção em relação às técnicas convencionalmente empregadas nos diferentes laboratórios (tabela 7).

Um estudo amplo foi efetuado sobre a prevalência geral de diferentes parasitoses empregando a técnica de *TF-Test* e técnicas convencionais (tabela 8). A prevalência de infecção por protozoários intestinais de 69,0% (159/833) foi significativamente ($z_{obtido} = 11,2$; $p < 0,05$) mais elevada que a de infecções por helmintos de 19,1% (159/833). Os dados aqui obtidos demonstram também que a técnica de *TF-Test* apresentou maior positividade que as técnicas convencionais, tanto para a detecção de helmintos como de protozoários ($z_{obtido} > 9,0$; $p < 0,05$).

Para determinar se a técnica de *TF-Test* era ou não mais eficiente que a técnica de *Coprotest*, usando *kit* comercial, em detectar diferentes espécies parasitárias, realizou-se um estudo envolvendo 291 indivíduos apresentando

infecção parasitária simples ou múltipla, e foram detectados nesses 457 infecções (tabela 9). A positividade encontrada por técnica em questão foi alta, de 90,6% contra 75,5% daquela da técnica de *Coprotest*; e a diferença entre estas sensibilidades foi significativa ($z_{obtido} = 10,7; p < 0,05$). Constatou-se ainda que, em um estudo de 113 casos positivos para helmintíases intestinais, a técnica de *TF-Test* detectou 93,8%, sendo significativamente mais elevado ($z_{obtido} = 2,6; p < 0,05$) que a positividade de 82,3% encontrada pela técnica de *Coprotest*. Na detecção de protozoários, a primeira técnica foi positiva para 89,5%, mais elevada ($z_{obtido} = 5,4; p < 0,05$) que a segunda de 73,2%, no estudo de 344 casos diagnosticados para infecções por protozoários intestinais.

A técnica de *TF-Test* foi também comparada com as técnicas parasitológicas convencionais que consistiram de combinação de três técnicas, Lutz, Faust & Cols.e Rugai & Cols., a fim de determinar a eficiência diagnóstica de *TF-Test* em detectar infecções por helmintos, protozoários intestinais e larvas de nematóides (tabela 10).

Os dados obtidos no estudo de 256 pacientes, sendo 155 destes com infecção parasitária simples ou múltipla, mostraram uma positividade maior para a técnica de *TF-Test*, porém na detecção de helmintos a positividade encontrada (75,0%) não diferiu estatisticamente ($z_{obtido} = 1,7; p > 0,05$), quando comparada com a positividade obtida na combinação de três técnicas (61,8%). Na detecção de protozoários (87,6%), ou no total de formas parasitárias (85,1%), as positivities de *TF-Test* foram significativamente maiores ($z_{obtidos} > 2,1; p < 0,05$) em relação à combinação de técnicas (44,7%). Em relação à técnica de Rugai, Mattos & Brisola, os achados foram nitidamente diferentes (75% versus 16,2%; 87,6% versus 11,0% ou 85,1% versus 12,0%). Foi observado que somente com três repetições de exames parasitológicos, por técnica de Rugai & Cols., os achados em larvas de nematóides tornaram-se semelhantes aos de *TF-Test*.

Realizou-se ainda um estudo com a finalidade de determinar o número de repetições necessárias de exame parasitológico, utilizando a associação dessas três técnicas, para que o nível de positividade atingisse aquele apresentado pela técnica de *TF-Test*, que processa as três amostras em uma única etapa no laboratório. A tabela 11 apresenta o encontro de positividade de 85,1% por *TF-Test*, já na primeira coleta de amostra fecal em triplicata, enquanto que na associação de três técnicas, que se fazia uma única coleta de amostra, a positividade cumulativa foi aumentada de mais 25,1%, com a segunda coleta de amostras e, na terceira, o ganho foi de 15,7%, alcançando o

nível de positividade semelhante ao de *TF-Test*. Vale salientar que, a positividade de 89,1% obtida com três repetições na associação de três técnicas, não diferiu estatisticamente de 85,1% de positividade obtida pela técnica de *TF-Test* ($z_{obtido} = 1,5; p > 0,05$).

O estudo amplo realizado com 1.244 indivíduos, em diferentes laboratórios clínicos do Estado de São Paulo e um do Estado da Bahia, possibilitou determinar, de forma evidente, o desempenho diagnóstico de *TF-Test*, quando comparado com demais técnicas convencionais. A eficiência diagnóstica para cada uma das técnicas, expressa em termos de índice de concordância k , bem como, a categoria a qual o índice pertencia, de acordo com um critério estipulado de classificação, está apresentada na tabela 12.

Observou-se que a técnica de *TF-Test* apresentou índices k , tendo concordância *Quase Perfeita* para os quatro diferentes laboratórios, onde as infecções por parasitos intestinais foram consideradas moderadas ou baixas, com bases na presença de infecções simples, duplas, triplas e múltiplas. Contudo em dois laboratórios (Hosp. Aliança e Previlab) onde o número de pacientes estudados foi pequeno (125 e 16), os índices k obtidos não foram estatisticamente significativos ($z_{obtidos} < 1,8; p > 0,05$).

Em dois laboratórios (UNICAMP e USP) onde a intensidade de infecção foi considerada alta, os índices k encontrados para a técnica de *TF-Test* ocuparam a posição na categoria *Substancial*, significativamente acima dos de técnicas convencionais lá empregadas.

3.3 Controle de qualidade dos resultados obtidos

Os resultados obtidos em diferentes laboratórios foram considerados reprodutíveis, considerando que 70% a 85% destes resultados apresentaram índices relativos de positividade compatíveis com as características de cada laboratório. Assim, o laboratório da UNITAU apresentou 85% dos índices variando de 0,719 a 0,739 (índice padrão = $0,729 \pm 0,1$); o laboratório da USP apresentou 70% de índices que variaram de 0,600 a 0,871 (índice padrão = $0,796 \pm 0,2$); o laboratório da UNICAMP, 83% de índices entre 0,839 a 0,972 (índice padrão = $\pm 0,890 \pm 0,1$); e o laboratório da UNESP, 70% de índices entre 0,714 a 0,875 (índice padrão = $0,795 \pm 0,1$). Neste critério de análise, valores acima de 70% foram considerados significativos.

3.4 Características do *Kit TF-Test* para usuários

O novo *kit* foi considerado, pelos profissionais de laboratórios participantes, como sendo prático, rápido, higiênico, e reprodutível apresentando alta sensibilidade diagnóstica em relação às técnicas parasitológicas convencionais, de uso rotineiro em laboratórios de referência ou naqueles altamente conceituados. Ademais, o emprego deste *kit* exige muito pouco espaço no laboratório, o que o torna factível de ser adquirido também por laboratórios diagnósticos de pequeno porte. Algumas opiniões enfatizam que uma vez implantado o uso do *kit* na rotina laboratorial, dificilmente poderia retornar às técnicas parasitológicas convencionais, devido aos benefícios que vem a gerar na rotina laboratorial.

Um total de 80 questionários foram respondidos pelos pacientes e indivíduos residentes em áreas endêmicas de parasitoses intestinais. Cerca de 90% dos questionários referiam-se sobre a facilidade e praticidade quanto ao manuseio do *kit* para a coleta de amostras fecais, uma vez que houve uma atenção especial em orientá-los e fornecer esclarecimentos apropriados por parte de atendentes ou profissionais nos laboratórios. Aspecto higiênico foi também salientado como sendo um fator importante, porquanto, não houve a necessidade de manter as amostras fecais coletadas em geladeira, ao lado de alimentos. Ademais, a coleta tripla de amostra fecal com o *kit TF-Test* evita o trabalho do paciente em retornar ao laboratório por mais vezes.

3.5 Aspectos de custo-benefício

No presente momento, só dispomos de conhecimento de que a indústria ao efetuar suas estimativas quanto ao custo na produção do *kit* definitivo, sem considerar os aspectos tributários e de margem de lucro, na indústria e na distribuição do produto para comercialização. O custo básico de fabricação na indústria foi estimado como sendo de R\$ 1,20 por unidade de *kit*, incluindo: injeção termoplástica, envase industrial de solução preservadora, montagem de *Kit* e embalagens.

Acreditamos que o custo final será interessante e competitivo no mercado consumidor devido, o Serviço Único de Saúde (SUS) repassar aos laboratórios públicos o valor de R\$ 1,88 para técnicas que processem múltiplas coletas de material fecal em líquido preservador e, os laboratórios privados apresentar tabela para o exame parasitológico das fezes que pode variar de R\$ 3,80 a R\$ 7,00.

Ademais, o novo *Kit* deverá apresentar ao laboratório ganho em produtividade, por tratar-se de uma técnica rápida e totalmente descartável e, ganho em espaço físico, por apresentar um processamento concentrado com pouco deslocamento de profissionais.

Tabela 5. Resultados obtidos por técnica de *TF-Test* e por outras técnicas convencionais utilizadas em seis diferentes laboratórios dos Estados de São Paulo e da Bahia, no estudo de 1.244 indivíduos, portadores de simples e múltiplas infecções parasitárias.

Local (Total de indivíduos)	Técnica	Indivíduos infectados		Tipo de infecção				Número de infecção (amostras positivas)
		Nº	(%)	Simple	Dupla	Tripla	Múltipla ^a	
UNITAU (309)	<i>TF-Test</i>	100	(32,4)	76	16	7	1	134
	<i>Coprotest</i>	80	(25,9)	62	14	3	1	104
	Ambas Téc.	102	(33,0)	77	17	7	1	137
UNESP (300)	<i>TF-Test</i>	35	(11,7)	32	3	0	0	38
	<i>Coprotest</i>	31	(10,3)	29	2	0	0	33
	Ambas Téc.	43	(14,3)	40	3	0	0	46
UNICAMP (238)	<i>TF-Test</i>	138	(57,9)	79	26	19	14	242
	<i>Coprotest</i>	109	(45,8)	59	25	14	11	208
	Ambas Téc.	146	(61,3)	76	30	21	19	275
USP (256)	<i>TF-Test</i>	134	(52,3)	42	42	31	18	298
	Três Téc. ^b	111	(43,4)	70	32	3	6	169
	Todas Téc.	155	(60,5)	50	50	31	25	350
H. Aliança (125)	<i>TF-Test</i>	14	(11,2)	10	4	0	0	16
	Lutz	10	(8,0)	9	1	0	0	11
	Ambas Téc.	16	(12,8)	12	4	0	0	18
Previlab (16)	<i>TF-Test</i>	5	(31,2)	4	1	0	0	6
	Lutz	1	(6,2)	0	1	0	0	2
	Ambas Téc.	5	(31,2)	4	1	0	0	6
Total: (1244)		467	(37,5)	259	103	31	104	832

^a Infecção múltipla = média de 4 infecções parasitárias; ^bTrês técnicas = Combinação das técnicas de Lutz, Faust & cols. e Rugai, Mattos & Brisola.

Tabela 6. Sensibilidade obtida por técnica de *TF-Test* e por diferentes técnicas convencionais, no estudo de 1.244 amostras fecais de pacientes de ambulatório e de áreas endêmicas de enteroparasitoses, em seis diferentes laboratórios.

Localidade	Sensibilidade				
		%	<i>TF-Test</i> (no. pos/total pos.)	%	Outras Técnicas (no. pos/total pos.)
UNICAMP (SP)	88,0*	(242/275)	75,6	(208/275)	(1)
USP (SP)	85,1*	(298/350)	48,3	(169/350)	(2)
Previlab (SP)	100	(6/6)	33,3	(2/6)	(3)
UNITAU (SP)	97,8*	(134/137)	75,9	(104/137)	(1)
UNESP (SP)	82,6	(38/46)	71,7	(33/46)	(1)
Hosp.Aliança (BA)	88,9	(16/18)	61,1	(11/18)	(3)
Três Lab. (SP)	90,4*	(414/458)	75,3	(345/458)	(1)

* $P < 0,05$

1 = *Coprotest*; 2 = Combinação de Lutz, Faust & Cols. e Rugai & cols.; 3 = Lutz

Tabela 7. Sensibilidade da técnica do *TF-Test* em relação às outras técnicas convencionais, no estudo de 1.244 indivíduos de diferentes laboratórios localizados em regiões do Estado de São Paulo e do Estado da Bahia, onde o poliparasitismo é alto, médio e baixo.

Poliparasitismo	Sensibilidade % (no. pos./total pos.)	
	<i>TF-Test</i>	Outras Técnicas Convencionais
Alto	86,4 * (540/625)	60,3 (377/625)
Moderado	97,8 * (134/137)	75,9 (104/137)
Baixo	85,7 * (60/70)	65,7 (46/70)

* $p < 0,05$

Tabela 8. Diagnóstico de parasitos por técnica de *TF-Test* e por outras técnicas convencionais, no estudo de 1.244 indivíduos portadores de simples ou múltiplas infecções, procedentes de laboratórios das Universidades UNICAMP/Campinas-SP, UNESP/Botucatu-SP, UNITAU/Taubaté-SP e USP/São Paulo-SP e, dos laboratórios privados Hospital Aliança-BA e Previlab-SP.

Parasito	Técnica Parasitária		Positividade Total (no. positivos)
	<i>TF-Test</i> (no. positivos)	Convencional ^a (no. positivos)	
Helminto			
<i>Trichuris trichiura</i>	45	35	48
<i>Ascaris lumbricoides</i>	42	35	43
<i>Strongyloides stercoralis</i>	31	23	40
Ancylostomatidae	18	17	22
<i>Schistosoma mansoni</i>	12	13	18
<i>Enterobius vermicularis</i>	9	10	11
<i>Hymenolepis nana</i>	2	2	2
	159 (86,4%)	135 (73,4%)	184 (100%)
Protozoário			
<i>Endolimax nana</i>	154	108	174
<i>Entamoeba coli</i>	162	109	166
<i>Blastocystis hominis</i>	111	75	129
<i>Giardia intestinalis</i>	94	64	93
<i>Iodamoeba butschilli</i>	30	20	33
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	9	9	21
<i>Entamoeba hartmani</i>	3	5	8
<i>Chilomastix mesnili</i>	1	2	2
<i>Isospora belli</i>	1	0	1
	575 (88,6%)	392 (60,5%)	649 (100%)
Total:	734 (88,1%)	527 (63,3%)	833 (100%)

^a Técnicas convencionais de Lutz, Faust & cols., Rugai, Mattos & Brisola e Coprotest.

Tabela. 9 Diagnóstico de parasitos pelo *Kit TF-Test*, *Coprotest* e ambas técnicas em fezes de 291 pacientes com simples ou múltipla infecção parasitária intestinal procedentes das universidades UNICAMP-SP, UNESP/Botucatu-SP e UNITAU/Taubaté-SP.

Parasitos	<i>Kit TF-Test</i>	<i>Coprotest</i>	Ambas Técnicas
Helmintos intestinais			
<i>Trichuris trichiura</i>	34	29	36
<i>Ascaris lumbricoides</i>	28	26	29
<i>Strongyloides stercoralis</i>	17	10	19
Ancilostomatídeos	12	14	14
<i>Hymenolepis nana</i>	8	8	8
<i>Schistosoma mansoni</i>	6	6	6
<i>Enterobius vermicularis</i>	1	0	1
	106 (93,8%)	93 (82,3%)	113 (100%)
Protozoários intestinais			
<i>Entamoeba coli</i>	87	74	95
<i>Blastocystis hominis</i>	82	65	93
<i>Giardia intestinalis</i>	58	50	61
<i>Endolimax nana</i>	55	45	64
<i>Iodamoeba butschilli</i>	22	15	26
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	3	2	3
<i>Entamoeba hartmani</i>	1	0	1
<i>Chilomastix mesnili</i>	0	1	1
	308 (89,5%)	252 (73,2%)	344 (100%)
Total	414 (90,6%)	345 (75,5%)	457 (100%)

Tabela 10. Diagnóstico de parasitos intestinais pela técnica de *TF-Test*, combinação de três técnicas e todas técnicas, em amostras fecais 155 pacientes portadores de simples ou múltipla infecção parasitária, procedentes do Hospital de Clínicas, da Universidade de São Paulo (USP).

Parasito	Técnica Parasitológica			
	<i>TF-Test</i> (no. pos.)	Comb. Téc. ^a (no. pos.)	Rugai (no. pos.)	Todas Técnicas (no. pos.)
Helminto				
<i>Strongyloides stercoralis</i>	15	15	9	23
<i>Ascaris lumbricoides</i>	12	9	1	12
<i>Trichuris trichiura</i>	11	6	1	12
<i>Schistosoma mansoni</i>	6	7	0	11
Ancylosmatidae	6	3	0	8
<i>Enterobius vermicularis</i>	1	2	0	2
	51 (75,0%)	42 (61,8%)	11 (16,2%)	68 (100%)
Protozoário				
<i>Endolimax nana</i>	94	61	19	109
<i>Entamoeba coli</i>	67	29	6	70
<i>Giardia intestinalis</i>	32	11	3	32
<i>Blastocystis hominis</i>	29	10	1	37
<i>Iodamoeba butschilli</i>	6	2	0	7
<i>Entamoeba hartmani</i>	2	5	1	7
<i>Chilomastix mesnili</i>	1	1	0	1
<i>Isospora belli</i>	1	0	0	1
	247 (87,6%)	126 (44,7%)	31 (11,0%)	282 (100%)
Total	298 (85,1%)	168 (48,0%)	42 (12,0%)	350 (100%)

^a Técnicas combinadas de Lutz, Faust & cols. e Rugai, Mattos & Brisola.

Tabela 11. Positividade observada na técnica de *TF-Test* e o aumento cumulativo de positividade na combinação de técnicas, Lutz , Faust & Cols.e Rugai, Mattos & Brisola, com o aumento do número de coleta de amostras fecais, no estudo de 154 pacientes do Hospital de Clínicas, da Universidade de São Paulo (USP).

Coleta de Amostras	Técnicas Parasitológicas	
	<i>TF-Test</i> % (no. pos./total pos.) ^a	Lutz, Faust e Rugai % (no. pos./total pos.)
1 ^a	-	48,3 (169/350)
2 ^a	-	73,4 (257/350)
3 ^a	85,1 (298/350)	89,1 (312/350)

^a Número de infecções parasitárias

Tabela 12. Índices *Kappa* (*k*) em um estudo de 1.244 resultados positivos e negativos para enteroparasitos obtidos por diferentes técnicas em cinco laboratórios do Estado de São Paulo e um laboratório do Estado da Bahia.

Local	Técnica	Índice <i>k</i>	Classificação <i>k</i>
UNITAU-SP	<i>TF-Test</i>	0,976 *	Quase perfeito
	<i>Coprotest</i>	0,785 *	Substancial
UNESP -SP	<i>TF-Test</i>	0,877 *	Quase perfeito
	<i>Coprotest</i>	0,799 *	Substancial
UNICAMP-SP	<i>TF-Test</i>	0,782 *	Substancial
	<i>Coprotest</i>	0,601 *	Moderado
USP -SP	<i>TF-Test</i>	0,715 *	Substancial
	Comb. Téc. ^a	0,287 *	Fraco
Hosp.Aliança-BA	<i>TF-Test</i>	0,924	Quase perfeito
	Lutz	0,744	Substancial
Previlab-SP	<i>TF-Test</i>	1,000	Quase perfeito
	Lutz	0,256	Fraco
UNITAU, UNESP e UNICAMP	<i>TF-Test</i>	0,906 *	Quase perfeito
	<i>Coprotest</i>	0,765 *	Substancial

^a Técnicas combinadas de Lutz, Faust & cols. e Rugai, Mattos & Brisola.

* $P < 0,05$

4. DISCUSSÃO

Enteroparasitoses humanas se constituem atualmente em sério problema de saúde pública, notadamente em se tratando de países em desenvolvimento e, como comentado anteriormente, podem ocasionar formas graves de doenças e mortes.

Até o presente momento, os exames parasitológicos das fezes geralmente são efetuados com apenas uma amostra fecal coletada de pacientes, utilizando técnicas que envolvem processo mecânico, biológico ou *kit* comercial. Nem sempre essas técnicas são eficientes em detectar protozoários juntamente com helmintos.

Desta forma, preconiza-se a associação de técnicas parasitológicas, porém, observou-se que apesar da melhoria no diagnóstico de parasitoses intestinais, se a coleta de amostra fecal for única, somente um terço à metade das espécies parasitárias presentes no bolo fecal serão reveladas (De Carli, 2001). Tornou-se evidente que além da necessidade de combinar as técnicas parasitológicas tem-se também que realizar repetições de exames, coletando novas amostras fecais.

Esta observação é confirmada por nossos achados (tabela 9 e tabela 10) do apêndice, em que as técnicas de Lutz, Faust & cols. e Rugai, Mattos & Brisola, isoladamente são pouco sensíveis, variando de 12,0% a 38,3%, enquanto que com a combinação destas três técnicas ocorre aumento na sensibilidade (48,0%). Porém, se estas três técnicas forem repetidas por mais duas vezes com novas coletas de amostras fecais, a sensibilidade aumenta significativamente (89,1%), com acréscimo de 40,8%. Dependendo da frequência de infecção parasitária e da técnica empregada, o ganho em positividade varia de acordo com autores de 22,7% (Hiatt et al., 1995) a 41,7% (Nazer et al., 1993 e Catwright, 1999).

Infelizmente, este procedimento não só toma o tempo do paciente fazendo-o a retornar três vezes ao laboratório, mas também, onera o exame laboratorial tornando-o impraticável na rotina diagnóstica, principalmente, devido aos baixos repasses financeiros aplicados por órgãos públicos (DataSus, 2002).

No entanto a recomendação atual é a de realizar pelo menos três exames de fezes que são coletados em dias diferentes e não ultrapassando o período de 10 dias, utilizando uma determinada técnica parasitológica, a fim de solucionar o problema da ocorrência de resultados negativos falsos que são frequentes em infecções de intensidade moderada ou baixa. Contudo este procedimento na rotina laboratorial não tem sido efetuado devido a diversos fatores não práticos e factíveis.

A técnica de *TF-Test* utilizando o protótipo de *kit* consiste em processar totalmente três amostras fecais coletadas em dias diferentes, em uma única etapa, por meio de filtração dupla, e concentração do sedimento por centrifugação rápida, concentrando desta maneira as formas parasitárias. Até o presente momento, não se conhece técnica que processe três amostras fecais coletadas em dias diferentes de uma só vez. A parte original do *kit* consiste então em processar três amostras fecais em uma única etapa, tendo um sistema de dupla filtração, sendo as malhas do primeiro filtro mais grossas que as do segundo, as quais reduzem consideravelmente partículas fecais, possibilitando melhor visualização de formas parasitárias à microscopia de luz. Contudo, o processo de concentração de formas parasitárias por centrifugação é conhecido há muito tempo (Teleman, 1908). Na técnica de *TF-Test*, utiliza-se também o acetato de etila para proporcionar a separação de componentes com diferentes densidades por meio de centrifugação do material fecal suspenso em solução neutra de formalina. O acetato de etila é o substituto encontrado por Young (1979) para a solução de formalina-éter originalmente descrita por Ritchie (1948), embora esta técnica tenha sofrido modificações posteriormente (Maldonado, 1953 e 1954). No sedimento obtido por *TF-Test*, as formas parasitárias como, ovos e larvas de helmintos, além de cistos de protozoários foram encontradas em boas condições, mantendo suas características morfológicas para identificação rápida.

Introduziram-se melhoramentos e estabeleceu-se a padronização do processo de fabricação do protótipo do *kit*, bem como, a otimização dos fatores que interferem na técnica do *TF-Test* em condições de laboratório. Fatores, tais como, a proporção de amostra fecal e o volume de solução preservadora de formas parasitárias, temperatura, substância removedora de lípidos, detergente, condição de centrifugação, vazamento de líquido do *kit*, tempo de conservação de formas parasitárias. A vantagem do *kit* é a possibilidade de conservar as amostras coletadas à temperatura ambiente por mais de 30 dias, dispensando o uso de refrigerador, portanto, demonstrando ser apropriado para estudos de enteroparasitoses em populações. Observou-se que o *kit* apresenta flexibilidade quanto ao seu uso, pois, permite a utilização de diferentes tipos de soluções preservativas ou em alguns tubos com e outro sem nenhuma solução preservativa, por exemplo, quando: 1) é exigida cultura bacteriana, além do exame parasitológico; 2) há necessidade de preparar lâminas coradas, no diagnóstico de oocistos de coccídeos, em casos de pacientes imunocomprometidos; e 3) se deseja coletar três amostras do mesmo material fecal, etc.

Em geral, o desempenho diagnóstico da técnica de *TF-Test* foi melhor que as técnicas convencionais isoladamente ou combinadas (Lutz, Faust & Cols. e Rugai, Mattos & Brisola) ou técnicas que empregam *kits* comerciais (*StillQuick*, *Coprotest* e *Parasep*). Este achado era esperado, porquanto, observaram-se que se fosse feita uma mistura de três amostras fecais de dias diferentes (Aldeen et al., 1993), ou então de três amostras coletadas no mesmo dia (Tavares-Neto et al., 1993) ocorria enriquecimento ou concentração de formas parasitárias.

A primeira fase de avaliação no próprio laboratório da UNICAMP foi estrategicamente necessária, pois, se nesta fase os resultados não fossem consistentes, o trabalho não teria continuidade em diferentes laboratórios para a confirmação dos dados obtidos; subsídios estes imprescindíveis para a posterior industrialização do *kit*.

Ainda nesta fase, a técnica de *TF-Test* foi avaliada em comparação com a técnica de Kato-Katz. Para alta carga parasitária, expressa em ovos por grama de fezes (OPG), a nova técnica apresentou resultado comparável ao da técnica de Kato-Katz. Porém, para baixa carga parasitária (< 100 OPG), a sua positividade foi maior que a técnica de Kato-Katz. Talvez, a perda de sensibilidade ocorrida para a técnica de Kato-Katz, quando a carga parasitária é baixa, se deva à técnica em si, que utiliza pequena quantidade de amostra fecal, equivalente a 50 ou 60mg para se efetuar a leitura em uma lâmina comum de microscopia (26 x 76mm) , contra aproximadamente 4 gramas utilizadas no *TF-Test*, cujas amostras são coletadas em três dias alternados. Estudos neste sentido foram realizados em áreas de baixa endemicidade para a infecção por *Schistosoma mansoni*, demonstrando a proporcionalidade entre taxa de prevalência e número de lâminas examinadas, como fator de limitação das técnicas diagnósticas em detectar ovos em amostras de indivíduos com baixa carga parasitária (De Vlas & Gryseis, 1992; Araujo, 2000).

Vale ressaltar que, em vista das dificuldades técnicas em uma rotina laboratorial para a realização de múltiplas lâminas ou para o exame de mais de uma amostra de cada indivíduo, grande parte dos laboratórios praticam a leitura de apenas uma lâmina de microscopia na técnica de Kato-Katz (De Vlas e cols., 1992; Araujo, 2000).

As avaliações do *kit* foram efetuadas em seis laboratórios, mostrando diferentes graus de poliparasitismo: 1) baixo (UNESP, Hospital Aliança e Previlab), tendo infecções simples e duplas; 2) média (UNITAU), tendo infecções simples, duplas e triplas; e alta (UNICAMP E USP), tendo infecções simples, duplas, triplas e múltiplas (em média 4 infecções). Nestas condições de avaliação, a técnica de *TF-Test* apresentou sensibilidades

significativamente mais elevadas em relação às demais técnicas convencionais.

Constatou-se ainda que a técnica foi também bastante sensível em detectar tanto os protozoários assim como helmintos, observando-se a predominância de *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* e *Blastocystis hominis*, entre os protozoários, e ancilostomatídeos, *Trichuris trichiura* e *Strongyloides stercoralis*, entre helmintos. *Blastocystis hominis*, segundo alguns autores, foi sugerido como sendo um patógeno causador de blastocistíase ou blastocistose (Markell, 1993; Doyle, 1990). A técnica de *TF-Test* apresentou diferença considerável (tabela 8) de 86,0% (111) de positividade *versus* 58,1% (75) de positividade obtida por técnicas convencionais. A diferença na positividade em detectar *B. hominis* pode ser atribuída ao fato de que as técnicas convencionais, constituídas por associação das técnicas de Lutz, Faust & Cols. e Rugai, Mattos & Brisola, processarem material fecal coletado fresco, sem fixação, e lavado em água corrente, o que destrói as formas vacuolares, granulares ou amebóide do parasito, fornecendo resultado negativo falso (De Carli, 2001).

Outro fato relevante caracterizado neste estudo foi a identificação de oocisto de *Isospora belli* pela técnica de *TF-Test*, mesmo sem a utilização de métodos de coloração específicos. É importante realçar que devido ao baixo índice de isosporíase humana, a frequência registrada no Estado de São Paulo é de menos de um caso para cada 1.000 exames (Rey, 2002). Este acontecimento talvez se deva ao procedimento inerente à técnica de *TF-Test*. Alguns autores sugerem que partes descartáveis do material utilizado em algumas técnicas, como por exemplo gaze, chegam a reter mais de 15% de oocistos de protozoários no momento da filtragem, devido às impurezas do material fecal (Weber et al, 1991).

Estudos recentemente realizados com parasitos gastrintestinais em ovinos, demonstraram a maior sensibilidade para detecção de coccídeos intestinais da técnica de *TF-Test* quando comparada com à técnica de Gordon & Whithlock (Lumina, 2004). A técnica deverá ser aprimorada a fim de possibilitar o diagnóstico apurado de coccídeos intestinais em humanos.

Ainda neste estudo, a prevalência de infecção por protozoários (69,0%) foi significativamente maior que de helmintos (19,1%). Este perfil é compatível com os dados epidemiológicos obtidos nos últimos dez anos em diferentes localidades, principalmente, do estado de São Paulo (Gioia, 1992 e Machado et al., 1999).

Efetou-se ainda comparação entre a técnica de *TF-Test* e de *Coprotest* comercial (tabela 9), tendo em mente a sua futura comercialização, observando-se a maior eficiência da primeira. Apesar da técnica do *Coprotest* comercial enriquecer as formas parasitárias por meio do processo de centrífugo-sedimentação, como acontece para a técnica de *TF-Test*, a coleta tripla de amostras fecais da última técnica melhora significativamente a detecção de formas parasitárias, corrigindo a falha na já referida distribuição não uniforme dos ovos de helmintos no bolo fecal e dos estágios dos protozoários intestinais. Vale ressaltar que, neste estudo, a nova técnica detectou um total de 414 parasitos nas amostras fecais, enquanto que a técnica de *Coprotest* detectou 345 parasitos, havendo uma diferença de 69 (15,1%) parasitos a menos, que foram significativos. Os resultados com maior número de discrepâncias ocorreram na identificação de *Strongyloides stercoralis*, *Blastocystis hominis*, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *Giardia intestinalis* e *Iodamoeba butschilli*.

Larvas de nematóides em fezes humanas são diagnosticadas com certa frequência, principalmente, as larvas de *Strongyloides stercoralis*.

Normalmente as infecções por este parasito apresentam-se discretas, exigindo, portanto, técnicas específicas de isolamento dessas larvas baseando-se no fenômeno de hidrotropismo positivo das mesmas. Mesmo em se tratando de técnicas de extração de larvas da massa fecal por procedimento de hidro e termotropismo, recomenda-se a repetição de exame das fezes. Um só exame de fezes revela de 60 a 80% dos casos positivos, devendo-se repeti-lo três a cinco vezes para conseguir 100% de resultados positivos (Rey, 2002). A técnica de *TF-Test* detectou larvas do nematóide *S. stercoralis* (tabela 10), todavia, em vista do número reduzido de casos (15) *versus* a técnica de Rugai, Mattos & Brisola que também detectou pequeno número de casos (9), cuja diferença não foi estatisticamente significativa ($z_{obtido} = 1,83; p > 0,05$). Assim, a técnica deverá ser posteriormente avaliada com maior número de casos. No entanto, os achados de nematóides com a técnica nova quando comparados com os de outras técnicas convencionais sugerem a superioridade do *TF-Test*.

No segundo tipo de avaliação, analisamos a eficiência diagnóstica das técnicas com base no índice k de concordância para resultados positivos e negativos em relação aos dados de referência (combinação de todas as técnicas usadas). O índice k define melhor o desempenho diagnóstico de diferentes técnicas que simples achados em porcentagens de concordância ou discordância. No laboratório da UNESP, apesar da sensibilidade obtida para a

técnica de *TF-Test* não ter diferido significativamente da técnica de *Coprotest*, o índice *k* foi significativamente maior que o de *Coprotest*. Este resultado é explicado pelo fato de que, no índice *k*, grande número de resultado negativo (257) é incluído juntamente com o de positivos (43), utilizados na determinação de sensibilidade.

O índice *k* obtido para a técnica de *TF-Test*, no conjunto de laboratórios que empregam convencionalmente a técnica de *Coprotest*, correspondeu a uma concordância *Quase Perfeita*. Porém se considerarmos os dados de laboratórios individualmente, em quatro laboratórios a concordância foi *Quase Perfeita*, embora em dois desses não fossem significativos, e dois a concordância foi substancial. É interessante notar que em laboratórios onde houve alta intensidade de infecção, o índice de concordância foi *Substancial*, sendo que no laboratório da UNICAMP na primeira fase do projeto quando o número de amostras fecais examinados foi menor (60) que na segunda fase (238), a concordância foi *Quase Perfeita*. Possivelmente diversos fatores influenciaram na eficiência diagnóstica desses laboratórios tais como: a) conceitos e procedimentos diferentes da nova técnica tanto para pacientes e pessoal técnico; b) necessidade de mais treinamento com a nova técnica para se alcançar o mesmo nível de adestramento da técnica convencional; e c) variância técnica, considerando que mais de um profissional de laboratório participou nesses laboratórios onde a frequência de infecção múltipla era alta. No entanto, os dados apontam a favor da nova técnica.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a sensibilidade da técnica de *TF-Test* está próxima das de técnicas sorológicas (Ferreira & Ávila, 2001) e, desta forma, há necessidade de efetuar avaliações posteriores quanto a este aspecto. Esta técnica parece apropriada para pacientes tratados ou para programas de controle das enteroparasitoses, considerando que as técnicas sorológicas são ineficientes para tal finalidade.

O *kit* foi planejado para melhorar a qualidade e eficiência de exame parasitológico em amostras fecais e, neste aspecto, os dados obtidos demonstram que o objetivo foi alcançado.

As informações coletadas mediante os questionários preenchidos por pacientes usuários do *kit*, assim como, as equipes de laboratório (dados não apresentados) confirmaram a sua utilidade. Segundo a avaliação de pacientes, pouca orientação é dada de forma correta aos pacientes, por parte de atendentes no laboratório para a coleta das amostras de fezes. Assim de acordo com os dados coletados, pode-se afirmar que os pacientes são na maioria conscientes da importância de se efetuar uma boa coleta de fezes.

Assim, os aspectos econômicos, práticos, e de alta sensibilidade do *TF-Test* mostra que o *kit* é aplicável para diagnóstico da enteroparasitoses em pacientes e em inquéritos epidemiológicos. Ademais, esta técnica poderá contribuir eficientemente para o monitoramento da quimioterapia durante o acompanhamento de populações tratadas em programas de controle de enteroparasitoses.

5. CONCLUSÕES

As características do protótipo do *kit TF-Test* quanto aos aspectos diagnósticos, operacionais e custo foram investigadas, realizando na primeira fase um estudo intralaboratorial, e na segunda fase, estudos interlaboratoriais. Os achados no presente trabalho permitiram concluir que:

- A técnica de *TF-Test* apresenta alta eficiência diagnóstica, pois, tanto na primeira fase como na segunda fase, sua sensibilidade foi significativamente maior que as técnicas convencionais (Lutz, Faust & Cols. e Rugai, Mattos & Brisola) ou técnicas que empregam *kit* comercial (*StillQuick*, *Coprotest* e *Parasep*),
- Na detecção de helmintos bem como de protozoários, a técnica é eficiente, sendo significativamente melhor que a das demais técnicas convencionais. Neste estudo, foi encontrando maior positividade para protozoários, tais como, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* e *Blastocystis hominis*, e para helmintos, ancilostomatídeos, *Trichuris trichiura* e *Strongyloides stercoralis*.
- A técnica de *TF-Test* se mostrou sensível em indivíduos com infecção alta (> 1.000 OPG) ou baixa (< 100 OPG) de *A. lumbricoides*, o mesmo não tendo ocorrido com a técnica de Kato-Katz que apresentou máxima positividade em infecção alta e, positividade moderada em infecção baixa.
- O protótipo do *kit* é de manuseio simples e prático para coleta de amostras fecais tanto por pacientes, bem como, para processamento dessas amostras por profissionais no laboratório, sendo higiênico por utilizar solução preservadora de formalina neutra, exigindo pouco contato com amostras fecais, e descartando o *kit* utilizado em recipiente apropriado, de biossegurança.
- As estimativas indicam que, do ponto de vista do custo-benefício, o *kit* a ser futuramente industrializado é satisfatório e competitivo, podendo ser adquirido mesmo por laboratórios de pequeno porte. Ademais, observou-se que, para se utilizar o *kit*, o espaço requerido para a implementação da técnica é reduzido e, portanto, econômico.

6. APÊNDICE

Laboratório A

Localidade: Taubaté-SP (UNITAU)

Nº total de indivíduos: 309

Total de indivíduos com enteroparasitoses: 102 (33%)

Total de indivíduos negativos: 207 (67%)

Tabela 1. Espécies de parasitos intestinais detectados por técnica de *TF-Test* e *Coprotest*, no estudo de 102 indivíduos infectados, residentes no Município de Taubaté-SP.

Espécie Parasitária	<i>TF-Test</i>	<i>Coprotest</i>	Total
<i>Entamoeba coli</i>	38	27	38
<i>Giardia intestinalis</i>	24	16	25
<i>Trichuris trichiura</i>	23	22	23
<i>Endolimax nana</i>	13	9	13
<i>Iodamoeba butschilii</i>	9	7	11
<i>Ascaris lumbricoides</i>	10	9	10
<i>Strongyloides stercoralis</i>	8	6	8
Ancylostomatidae	6	6	6
<i>Hymenolepis nana</i>	2	2	2
<i>Enterobius vermicularis</i>	1	0	1
Total	134	104	137

Tabela 2. Monoparasitismo e poliparasitismo encontrados no estudo de 102 indivíduos com enteroparasitoses do Município de Taubaté-SP.

Técnica	Tipo de infecção				Total de parasitos detectados	Nº de indivíduos infectados
	Único	Duplo	Triplo	Múltiplo		
<i>TF-Test</i>	76	16	7	1	134	100
<i>Coprotest</i>	62	14	3	1	104	80
Ambas as Técnicas	77	17	7	1	137	102

Sensibilidade *TF-Test* = 97,8% (134/137)

Especificidade *TF-Test* = 100% (207/207)

Sensibilidade *Coprotest* = 75,9% (104/137)

Especificidade *Coprotest* = 100% (207/207)

Laboratório B

Localidade: Botucatu (UNESP)

Nº total de indivíduos: 300

Total de indivíduos com enteroparasitoses: 43 (14,3%)

Total de indivíduos negativos: 257 (85,7%)

Tabela 1. Espécies de parasitos intestinais detectados por técnicas de *TF-Test* e *Coprotest*, no estudo de 43 indivíduos apresentando infecção, residentes no Município de Botucatu-SP.

Espécie Parasitária	<i>TF-Test</i>	<i>Coprotest</i>	Total
<i>Entamoeba coli</i>	15	15	19
<i>Endolimax nana</i>	14	8	16
<i>Giardia intestinalis</i>	6	7	7
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1	2	2
Ancylostomatidae	1	1	1
<i>Trichuris trichiura</i>	1	0	1
Total	38	33	46

Tabela 2. Monoparasitismo e poliparasitismo encontrados no estudo de 43 indivíduos com enteroparasitoses do Município de Botucatu-SP.

Técnica	Tipo de infecção				Total de parasitos detectados	Nº de indivíduos infecados
	Único	Duplo	Triplo	Múltiplo		
<i>TF-Test</i>	32	3	0	0	38	35
<i>Coprotest</i>	29	2	0	0	33	31
Ambas as Técnicas	40	3	0	0	46	43

Sensibilidade *TF-Test* = 82,6% (38/46)

Sensibilidade *Coprotest* = 71,7% (33/46)

Especificidade *TF-Test* = 100% (257/257)

Especificidade *Coprotest* = 100% (257/257)

Laboratório C

Localidade: Campinas (UNICAMP)

Nº Total de indivíduos: 238

Total de indivíduos com enteroparasitoses: 146 (61,3%)

Total de indivíduos negativos: 92 (38,7%)

Tabela 5. Espécies de parasitos intestinais detectados por técnicas de *TF-Test* e *Coprotest*, no estudo de 146 indivíduos infectados, residentes no Município de Campinas-SP.

Espécie Parasitária	<i>TF-Test</i>	<i>Coprotest</i>	Total
<i>Blastocystis hominis</i>	82	65	93
<i>Entamoeba coli</i>	34	32	38
<i>Endolimax nana</i>	28	28	35
<i>Giardia intestinalis</i>	28	27	29
<i>Ascaris lumbricoides</i>	18	17	19
<i>Iodamoeba butschilii</i>	13	8	15
<i>Trichuris trichiura</i>	10	7	12
<i>Strongyloides stercoralis</i>	8	2	9
<i>Schistosoma mansoni</i>	6	6	7
Ancylostomatidae	5	7	7
<i>Hymenolepis nana</i>	6	6	6
<i>Entamoeba histolytica /E. dispar</i>	3	2	3
<i>Entamoeba hartmani</i>	1	0	1
<i>Chilomastix mesnili</i>	0	1	1
Total	242	208	275

Tabela 6. Monoparasitismo e poliparasitismo encontrados no estudo de 146 indivíduos com enteroparasitoses no Município de Campinas-SP.

Técnica	Tipo de infecção				Total de parasitos detectados	Nº de indivíduos infectado
	Único	Duplo	Triplo	Múltiplo		
<i>TF-Test</i>	79	26	19	14	242	138
<i>Coprotest</i>	59	25	14	11	208	109
Ambas as Técnicas	76	30	21	19	275	146

Sensibilidade *TF-Test* = 88,0% (242/275)

Sensibilidade *Coprotest* = 75,6% (208/275)

Especificidade *TF-Test* = 100% (94/94)

Especificidade *Coprotest* = 100% (94/94)

Laboratório D

Localidade: São Paulo (USP)

Nº total de indivíduos: 256

Total de indivíduos com enteroparasitoses: 155 (60,5%)

Total de indivíduos negativos: 101 (39,5%)

Tabela 7. Espécies de parasitos intestinais detectados por técnicas de *TF-Test* e por combinação das técnicas de Faust & Cols., Lutz e Rugai, Mattos & Brisola, no estudo de 153 indivíduos com enteroparasitoses, residentes no município de São Paulo.

Espécie Parasitária	<i>TF-Test</i>	Faust, Lutz e Rugai*	Total
<i>Endolimax nana</i>	94	61	109
<i>Entamoeba coli</i>	67	30	71
<i>Blastocystis hominis</i>	29	10	36
<i>Giardia intestinalis</i>	32	11	32
<i>Strongyloides stercoralis</i>	15	15	23
<i>Entamoeba histolytica /E. dispar</i>	15	7	18
<i>Ascaris lumbricoides</i>	12	9	12
<i>Trichuris trichiura</i>	11	6	12
<i>Schistosoma mansoni</i>	6	7	11
Ancylostomatidae	6	3	8
<i>Iodamoeba butschilii</i>	6	2	7
<i>Entamoeba hartmani</i>	2	5	7
<i>Enterobius vermicularis</i>	1	2	2
<i>Chilomastix mesnili</i>	1	1	1
<i>Isospora belli</i>	1	0	1
Total	298	169	350

Tabela 8. Monoparasitismo e poliparasitismo, no estudo de 155 indivíduos com enteroparasitoses do Município de São Paulo.

Técnica	Tipo de infecção				Total de parasitos detectados	Nº de indivíduos infectado
	Único	Duplo	Triplo	Múltiplo		
<i>TF-Test</i>	43	42	30	18	298	133
Três técnicas*	70	32	3	6	169	111
Todas as técnicas	50	50	31	25	350	155

* Faust, Lutz e Rugai

Sensibilidade *TF-Test* = 85,1% (298/350) Especificidade *TF-Test* = 100% (103/103)
 Sensibilidade Três técnicas = 48,3% (169/350) Especificidade Três técnicas = 100% (103/103)

Tabela 9. Aumento da sensibilidade observada na combinação das técnicas de Faust & Cols., Lutz e Rugai, Mattos & Brisola, com a repetição da coleta de amostras de fezes.

Técnica	Sensibilidade		
	1ª. Coleta	2ª. Coleta	3ª. Coleta
<i>TF-Test</i>	85,1% (298/350)	-	-
	85,1% (298/350)		
Faust	25,4% (89/350)	41,7% (146/350)	60,6% (212/350)
Lutz	38,3% (134/350)	65,4% (229/350)	86,2% (302/350)
Rugai	12,0% (42/350)	19,4% (68/350)	30,3% (106/350)
	48,3 (169/350)	73,4% (257/350)	89,1% (312/350)

Obs: 85,1% e 89,1% ($p > 0,05$)

Laboratório E

Localidade: Salvador-BA (Hospital Aliança)

Nº total de indivíduos: 125

Total de indivíduos com enteroparasitoses: 16 (12,8%)

Total de indivíduos negativos: 109 (87,2%)

Tabela 10. Espécies de parasitos intestinais detectados por técnicas de *TF-Test* e Lutz, no estudo de dezesseis (16) indivíduos com enteroparasitoses, residentes no município de Salvador-BA.

Espécies Parasitárias	<i>TF-Test</i>	Lutz	Total
<i>Entamoeba coli</i>	6	4	6
<i>Giardia intestinalis</i>	3	3	3
<i>Iodamoeba butschlii</i>	2	3	3
<i>Endolimax nana</i>	2	1	3
<i>Ascaris lumbricoides</i>	2	0	2
<i>Entamoeba histolytica /E. dispar</i>	1	0	1
Total	16	11	18

Tabela 11. Monoparasitismo e poliparasitismo encontrados no estudo de 16 indivíduos com enteroparasitoses do município de Salvador-BA.

Técnica	Tipo de infecção				Total de parasitos detectados	Nº de indivíduos infectados
	Único	Duplo	Triplo	Múltiplo		
<i>TF-Test</i>	10	2	0	0	16	14
Lutz	9	1	0	0	11	10
Ambas as técnicas	12	2	0	0	18	16

Positividade *TF-Test* = 88,9% (16/18)

Positividade Lutz = 61,11% (11/18)

Negatividade *TF-Test* = 100% (109/109)

Negatividade Lutz = 100% (109/109)

Laboratório F

Localidade: Piracicaba-SP (Previlab Análises Clínicas)

Nº total de indivíduos: 16

Total de indivíduos com enteroparasitoses: 5 (31,2%)

Total de indivíduos negativos: 11 (68,8%)

Tabela 12. Espécies de parasitos intestinais detectados por técnicas de *TF-Test* e Lutz, no estudo de cinco indivíduos com enteroparasitoses, residentes no município de Piracicaba-SP.

Espécie Parasitária	<i>TF-Test</i>	Lutz	Total
<i>Endolimax nana</i>	3	1	3
<i>Entamoeba coli</i>	2	1	2
<i>Giardia intestinalis</i>	1	0	1
Total	6	2	6

Tabela 13. Monoparasitismo e poliparasitismo encontrados no estudo de cinco indivíduos com enteroparasitoses no município de Piracicaba-SP.

Técnica	Tipo de infecção				Total de parasitos detectados	Nº de indivíduos infectados
	Único	Duplo	Triplo	Múltiplo		
<i>TF-Test</i>	4	1	0	0	6	5
Lutz	0	1	0	0	2	1
Ambas as técnicas	4	1	0	0	6	5

Positividade *TF-Test* = 100% (6/6)

Positividade Lutz = 33,3% (2/6)

Negatividade *TF-Test* = 100% (11/11)

Negatividade Lutz = 100% (11/11)

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDEEN, W.E.; SHISENANT, J.; HALE, D.; MATSEN, J.; CARROLL, K. – Comparison of pooled formalin-preserved fecal specimens with three individual samples for detection of intestinal parasites. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 144-145, 1993.

AMATO NETO, V. & CORREA, L.L. - Exame Parasitológico das fezes. 5ed. São Paulo(SP), Sarvier, 1991. 92p.

ARAUJO, A.J.U.S. - Utilização do Método de Concentração em Formol-Acetato de Etila na Quantificação de Ovos de Helminthos e Avaliação de sua Aplicabilidade em Inquéritos Epidemiológicos. São Paulo, 2000. 57p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo).

CATWRIGHT, C.P. – Utility of multiple-stool-specimen ova and parasite examinations in a high prevalence setting. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 2408—2411.

CHIEFFI, P.P.; GRYSCHER, D.C.B.; AMATO NETO, V. - Diagnóstico e tratamento de parasitoses intestinais. *Rev. Bras. Clin. Terap.*; 26: 163-70, 2000.

CURRENT, W.L.; REESE, N.C.; ERNST, J.V.; BAILEY, W.S.; HEYMAN, M.B.; WEINSTEIN, W.M. 1983. - Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. *N. Engl. J. Med.* 308: 1252-1257.

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

DE CARLI, G.A. - Parasitologia Clínica - Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. 2ª ed. São Paulo, Editora Atheneu, 2001.

DE MUTH, J.E. – Basic Statistics and Pharmaceutical Applications. USA, Marcel Dekker, Inc., 1999, p. 529-542.

DIAS, L.C.S.; MANGINI, A.C.S.; TEIXEIRA, A.T.L.S.; DIAS, R.M.D.S. - Total Test e Métodos Usados no Exame de Fezes: um estudo comparativo. Rev. Bras. Pat. Clin., 29(2): 98, 1997.

DIAS, L.C.S.; TEIXEIRA, A.T.L.S.; ANDRADE, M.; MENDES, C.R.; PALMA, J.S.R. - Parasitoses Intestinais: Comparação entre Coprotest e outros métodos de exames de fezes. J. Bras. Patol. Clín. Med. Lab. 39; 239, 1998.

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

FAUST, E.C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C.; LINCICOME, D.R. - Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminthes in feces. J. Bras. Parasitol., 25: 241-62, 1939.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J., - Int. J. Parasitol., 30: 1305-22, 2000.

FEINSTEIN, A.R. - Clinical Epidemiology. The Architecture of Clinical Research. Philadelphia, U.S.A., Saunders Co., 1985, p. 185-186.

FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. – Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes, 2a. edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.

FERREIRA, M.S. & BORGES, A.S. - Parasitoses Oportunistas. Rev. Patol. Trop., 25(2): 187-201, 1996.

FERREIRA, M.S. - Estrongiloidíase. In. VERONESI, R. - Doenças Infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997, p. 856-65.

FLEISS, J.L. - Statistical Methods for Rates and Proportions. Nova York, John Wiley & Sons, 1981, p. 217-225.

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

GARCIA, L.S. & BRUCKNER, D.A. - Diagnostic Medical Parasitology. 3rd. ed. Washington, D.C.: A.S.M. Press, 1997.

GARCIA, L.C. - Diagnostic Medical Parasitology. 4th edition, A.S.M. Press, Washington D.C., U.S.A., 2001.

GIOIA, I. – The prevalence of intestinal parasitoses among the users of the Health Center. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 25: 177–182, 1992.

GOMES, J.F.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; DIAS, L.C.S.; ARAUJO, A.J.U.S.; CASTILHO, V.L.P. & NEVES, F.A.M.A. - Evaluation of a Novel *Kit (TF-Test)* for the Diagnosis of Intestinal Parasitic Infections. J. Clin. Lab. Anal. 2004; 18(2): 132-138.

GOMES, M.A.; PESQUEIRO, J.B.; FURST, C.; VALLE, P.R.; PESQUEIRO, J.L.; SILVA, E.F. - Improved method to distinguish *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Parasitology, 119: 359-62, 1999.

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

HANSON, K.L., CARTWRIGHT, C.P. – Use of an enzyme immunoassay does not eliminate the need to analyse multiple stool specimens for sensitive detection of *Giardia lamblia*. J. Clin. Microbiol., 39: 474-477, 2001.

HIATT, R.A.; MARKELL, E.K.; NG, E. – How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa Amer. J. Trop. Med. Hyg., 53: 36-39, 1995.

HOFFMAN, W.A.; PONS, J.A.; JANER, J.L. - The sedimentation-concentration method in schistosomiasis *mansoni*. Puerto Rico. J. Publ. Hlth, 9:281-298, 1934.

HOSHINO-SHIMIZU, S.; CAMARGO, M.E.; SHIMIZU, T. & NAGASSE, T. - A Study on the Reproducibility of a Stable, Lyophilized Reagent for the

Ghagas Disease Hemagglutination Test: Proposals for Quality Control Analysis. Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo (SP), 24:61-68, 1982.

HOSHINO-SHIMIZU, S.; KIMURA, R.T.; CHIEFF, P.P. - Esquistossomose mansônica. In: Ferreira AW, Ávila SLM ed. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 185-193, 1996.

HOSHINO-SHIMIZU, VAZ-DE-LIMA, L.R.A.; OLIVEIRA, M.I.; PEREIRA, C.A.; MOURA, A.; MENDONÇA, R.Z. - Measles serodiagnosis: production and evaluation of the IgM-Measles ELISA^{IAL} reagent. Braz. J. Microbiol., 32: 70-75, 2001.

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

HOSHINO-SHIMIZU, S.; GOMES, J.F.; DIAS, L.C.S.; ARAUJO, A.J.U.S.; CASTILHO, V.L.P. & NEVES, F.A.M.A. - Enteroparasitoses: Inovação Tecnológica do *Kit (TF-Test)* Destinado ao Exame Parasitológico, São Paulo (SP), J. Bras. Patol. Med. Lab., 38(3): 199, 2002.

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

I.B.G.E. (Instituto Brasileiro de Geografia Estatística). - Pesquisa de Assitência Médica Sanitária, 2002.

KANAMURA, H.Y.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; SILVA, L.C. - *Schistosoma mansoni* cercariae and schistosomulum antigens in serodiagnosis of schistosomiasis. Bull Pan. Am. Health Org., 26: 220-228, 1992.

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

KATZ, N.; COELHO, P.M.Z.; PELLEGRINO, J. - Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *Schistosoma mansoni* eggs added to human feces. J. Parasitol., 56: 1030-1033, 1970.

LUMINA, G. - Avaliação do "Kit TF-Test" para o diagnóstico das infecções por parasitos gastrintestinais em ovinos. Botucatu(SP), 2004. 30p. (Dissertação de mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista - UNESP).

LUTZ, A.O. - *Schistosomum mansoni* e a schistosomose, segundo observações feitas no Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 11:121-155, 1919.

MACHADO, R.C.; MARCARI, E.L.; CRISTANTE, S.F.V.; CENARETO, C.M.A. - Giardíases e helmintíases em crianças de crèches e escolares de 1o. e 2o. grau (públicas e privadas) da cidade de Mirassol (São Paulo, Brasil). Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 32: 697-704, 1999.

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

MALDONADO, J.F.; ACOSTA-MATIENZO, J.; VELIZ-HERRERA, F. - Comparative value fecal examination procedures in the diagnosis of helminth infection. Exp. Parasitol., 3:403-416, 1954.

MARKELL, E.K.; JOHN, D.T.; KROTOSKI, W.A. - Markell and Voges Medical Parasitology. 8th ed. Philadelphia (Pa) : W.B. Saunders Co., 1999.

MARTIN, L.K. & BEAVER, P.C. - Evaluation of Kato Trick-Smear Thechinique for Quantitative Diagnosis of Helminth Infections. Am. J. Trop. Med. Hyg., 17(3): 382-91, 1968.

MENDES, C.R. - Estudo Comparativo de Técnicas Parasitológicas e Imunológicas no Diagnóstico de Parasitos Intestinais. Campinas, 2002. 69pp. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP).

NAGASSE-SUGAHARA, T.K.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; PAGLIARINI, R.C., CELESTE, B.J. - Improvement of the slide hemagglutination test for rapid Chagas´disease screening in epidemiological surveys. Braz. J. Med. Biol. Res., 29:623-628, 1996.

NAZER, H.; GREER, W.; SONNELLY, K.; MOHAMED, A.E.; YAISH, H.; KAGALWALLA, P.R. – The need for three stool specimens in routine laboratory examinations for intestinal parasites. *Br. J. Clin. Pract.*, 47: 76-78, 1993.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, M.P. - *Parasitologia Humana*. 10ed., São Paulo (SP), Editora Atheneu, 2001.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD: Modelo O.M.S. de información sobre la prescripción de medicamentos: Medicamentos utilizados em las enfermedades parasitarias. Ginebra, O.M.S., 1991.

PÊSSOA, S.B. & MARTINS, A.V. - *Parasitologia Médica*. 11^a ed., Rio de Janeiro (RJ), Editora Guanabara Koogan S.A., 1982.

REY, L. - *Bases da Parasitologia Médica*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro (RJ), 2002.

RITCHIE, L.S. 1948. - An ether sedimentation technique for routine stool examinations. *Bulletin of the U.S. Army Medicine Department* 8: 326.

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

SAMPAIO TEIXEIRA, A.T.L.; GARLIPP, C.R.; BOTTINI, P.V.; MENDES, C.R. - Importância do Diagnóstico Laboratorial da Criptosporidiose Humana. *Rev. Bras. Pat. Clin. Med. Lab.*, 28: 105, 1992.

SHEATHER, A.L. - The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technic. *J. Comp. Ther.*, 36: 266-275, 1923.

SUZUKI, N. - Diagnostic method in intestinal helminth infections. In: Yokogawa M. ed. *Collect Papers on the Control of Soil-transmitted Helminthiases*. Tokyo: APCO Research Group, 25-33, v.1., 1980.

TAVARES-NETO, J.; FORLEO-NETO, E.; PRATA, A. – Distribuição de ovos de *Schistosoma mansoni* no bolo fecal. *Rev. Baiana de Saúde Púb.*, 220: 7-12, 1993.

TELEMANN, W. - Eine methode zur erleichterung der auffindung von parasiteneiern in den feces. Deutsch Med. Wschr, 34:1510-1511, 1908.

UDKOW, M.P. & MARKELL, E.K. - *Blastocystis hominis* : prevance in asymptomatic versus symptomatic hosts. J. Infec. Dis. 168: 242-4, 1993.

WEBER, R.; BRYAN, R.T.; JURANEK, D.D. - Improved Stool Concentration Procedure for Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Fecal Specimes. J. Clin. Microbiol. p. 2869-2873, 1992.

WHO - The control of *Schistosomiasis*. WHO Thechnical Report Series; 830, Geneva, 1993. 86p.

WILLIS, H.H. - A simple levitation method for the detection of hookworm ova. Med. J. Australia, 29: 375-376, 1921.

YANG, J.; SCHOLTEN, T. - A fixative for intestinal parasites permitting the use of concentration and permanent staining procedures. Am. J. Clin. Pathol., 67: 300-304, 1977.

YONG, K.H.; BULLOCK, S.L.; MELVIN, D.M.; SPRUILL, C.L. 1979. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the Formalin-ether sedimentation technique. J. Clin. Microbiol. 10: 852-853.

8. ANEXO

Instruções para utilização do *Kit TF-Test*:

a) Coleta - indicação para o paciente



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



2- Utilize a colher para coletar as fezes, coloque na colher a quantidade de fezes suficiente para preenchê-la. Não coloque excesso de fezes. No caso de fezes diarreicas, coloque-as diretamente no frasco até atingir a faixa de tolerância para coleta assinalada no frasco.



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



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



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



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

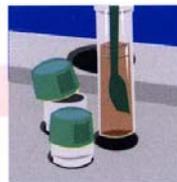
b) Processamento - indicação para o laboratório



1- Agite o tubo coletor para homogeneização do material fecal coletado.



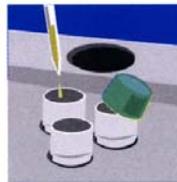
2- Abra o tubo coletor cuidadosamente, puxando e simulando o movimento de rosca, para não derramar o líquido.



3- Encaixe os tubos coletores na estante, com as tampas semi-abertas.



4- Acrescente uma gota de detergente neutro e incolor em cada tubo coletor.



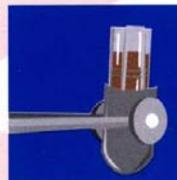
5- Acrescente 3 ml de acetato de etila p.a. por tubo e feche os tubos.



6- Com o auxílio da régua homogeneizadora, fixe os tubos coletores inseridos na estante e agite-os para homogeneizar o material.



7- Encaixe os 3 tubos coletores no conjunto de filtros e centrifugação.



8- Vire o sistema coletor-processador, de forma que os tubos coletores-usuário fiquem voltados para cima, e encaixe esse sistema à capa de centrifuga 100 ml universal.



9- Centrifugue o sistema a 500 x g por um minuto.



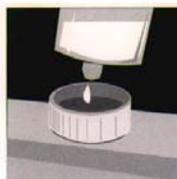
10- Desencaixe cuidadosamente o tubo de centrifugação do conjunto processador, puxando e simulando rosca.



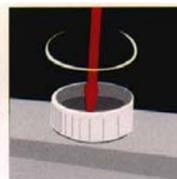
11- Descarte o sobrenadante em recipiente apropriado, segundo normas de biossegurança, inclinando cuidadosamente o tubo na horizontal.



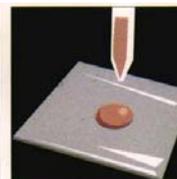
12- Encaixe o tubo de centrifugação na estante.



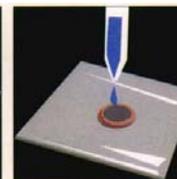
1- Acrescente ao sedimento cerca de 10 gotas de solução fisiológica.



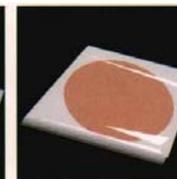
2- Homogeneize delicadamente.



3- Transporte de uma a três gotas do material homogeneizado para a lâmina de microscopia, utilizando canudo, pipeta pasteur ou plástica descartável.



4- Acrescente uma gota de lugol 2%.



5- Cubra o material com laminula 22x22 mm.



6- Examine o material preparado em microscópio de luz convencional com aumentos de 100 e 400 vezes.