



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

BIANCA MARTINS DOS SANTOS

**VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE *TF-TEST QUANTIFIED* PARA O
DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMÍASE MANSÔNICA**

CAMPINAS,

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

BIANCA MARTINS DOS SANTOS

**VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE *TF-TEST QUANTIFIED* PARA O DIAGNÓSTICO
DA ESQUISTOSSOMÍASE MANSÔNICA**

Este arquivo digital corresponde à
versão final da Dissertação
defendida pela aluna

Bianca Martins dos Santos

e orientada pelo Prof. Dr. Jancarlo
Ferreira Gomes

DISSERTAÇÃO apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para a obtenção do Título de
MESTRA em Biologia Animal, na área de Relações
Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. JANCARLO FERREIRA GOMES
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ALEXANDRE XAVIER FALCÃO

CAMPINAS,

2015

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

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

Sa59v Santos, Bianca Martins dos, 1987-
Validação da técnica de *TF-Test Quantified* para o diagnóstico da esquistossomíase mansônica / Bianca Martins dos Santos. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

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

1. Esquistossomose mansônica. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Contagem de ovos de parasitas. 4. Parasitologia - Métodos. I. Gomes, Jancarlo Ferreira, 1960-. II. Falcão, Alexandre Xavier, 1966-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Validation of the *TF-Test Quantified* technique for diagnosis of schistosomiasis mansoni

Palavras-chave em inglês:

Schistosomiasis mansoni

Schistosoma mansoni

Parasite egg count

Parasitology – Methods

Área de concentração: Relações Antrópicas, Desenvolvimento, Meio Ambiente e Parasitologia

Títuloção: Mestra em Biologia Animal

Banca examinadora:

Jancarlo Ferreira Gomes [Orientador]

Kátia Denise Saraiva Bresciani

Danilo Ciccone Miguel

Data de defesa: 31-08-2015

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Campinas, 31 de Agosto de 2015.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Jancarlo Ferreira Gomes (Orientador)

Profa. Dra. Kátia Denise Saraiva Bresciani

Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel

Prof. Dr. Carlos Noriyuki Kaneto

Profa. Dra. Urara Kawazoe

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

Dedico esse trabalho a minha mãe Ana Lúcia, a meu pai Fernando César e a todos aqueles que, apesar das dificuldades, continuam sempre acreditando na ciência.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador Professor Jancarlo Ferreira Gomes e ao meu co-orientador Professor Alexandre Xavier Falcão por toda paciência, ensinamentos, incentivos constantes nos momentos difíceis e apoio irrestrito na realização desse trabalho.

Ao Pesquisador Científico Celso Tetsuo Nagase Suzuki por suas observações concernentes que foram de importante contribuição na realização dessa pesquisa e pela ajuda na realização das análises estatísticas.

Ao Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela oportunidade de realização dessa pesquisa e por toda estrutura e apoio oferecidos.

Aos colaboradores técnicos e alunos do Laboratório de Helmintologia (L3) do Departamento de Biologia Animal da UNICAMP, pela pronta disposição em oferecer ajuda sempre que necessário.

Ao Laboratório de Informática Visual (LIV) em Biomedicina e Saúde do Instituto de Computação da UNICAMP, por todo apoio estrutural.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro de parte deste trabalho.

E, por último, a minha família pelo apoio incondicional e compreensão!

RESUMO

A esquistossomíase mansônica é altamente prevalente no mundo, sendo atualmente considerada como uma doença persistente que ocasiona alto número de óbitos em seres humanos. O diagnóstico desta moléstia, em grande parte, é realizado basicamente por meio de técnicas laboratoriais convencionais quantitativas, se destacando para isto o exame parasitológico das fezes. Entretanto, segundo relatos da literatura, os exames parasitológicos quantitativos empregados para esta diagnose podem apresentar baixas e moderadas sensibilidades diagnósticas, o que faz justificar a criação de novas técnicas mais sensíveis para esta finalidade, visando obter resultados eficientes principalmente às realizações de programas governamentais. Em vista do supracitado, o presente projeto de dissertação de mestrado teve como objetivo geral desenvolver, avaliar e validar uma nova técnica parasitológica (*TF-Test Quantified*) destinada à detecção quantificada de ovos de *Schistosoma mansoni*, em comparação com a técnica convencional de *Helm-Test*. As etapas metodológicas do presente projeto dependeram essencialmente em infectar, controlar e eutanasiar animais de experimentação, e desenvolver e validar a nova técnica parasitológica. Os resultados obtidos neste estudo quando avaliados estatisticamente entre as duas mencionadas técnicas parasitológicas, e confirmados com o Exame Padrão (*Gold Standard*), foram favoráveis à técnica de *TF-Test Quantified*, a qual apresentou 100% em termos de parâmetros diagnósticos de sensibilidade, 100% de positividade e concordância *Kappa (k)* e sua classificação como “*Quase Perfeita*”. O ganho de sensibilidade diagnóstica de forma quantificada que esta nova técnica deverá proporcionar será de estimável contribuição para inquéritos populacionais e controle desta parasitose, de modo a repercutir em contribuição social em Saúde Pública.

ABSTRACT

The schistosomiasis mansoni is highly prevalent worldwide, being considered as a persistent disease that causes high number of deaths in humans. The diagnosis of this disease, in large part, is performed basically by conventional quantitative laboratory techniques, especially the parasitological examination of faeces. However, according to published reports, the quantitative parasitological tests used for this diagnosis can provide low and moderate diagnostic sensitivity, which justifies the creation of new, more sensitive techniques for this purpose, in order to obtain efficient results mainly to government programs achievements. In view of the above, this dissertation project aimed to develop, evaluate and validate a new parasitological technique (*TF-Test Quantified*) for the quantified detection of *Schistosoma mansoni* eggs, compared with the conventional technique *Helm-Test*. The methodological steps of this project essentially depended on infect, control and euthanize laboratory animals, and to develop and validate the new parasitological technique. The results obtained in this study when evaluated statistically between the two mentioned parasitological techniques, and confirmed with the standard examination (*Gold Standard*), were favorable to the *TF-Test Quantified* technique, which presented 100% in terms of sensitivity of diagnostic parameters, 100% of positivity and agreement *kappa (k)* and their classification as "*Almost Perfect*". The diagnostic sensitivity gain in terms of quantification that this new technique should provide will be of estimable contribution to population surveys and control of this disease in order to reverberate social contribution in Public Health.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Infecção percutânea do camundongo por imersão da cauda em solução contendo cercarias com auxílio de suporte e dispositivo de contenção.....21
- Figura 2:** Camundongo eutanasiado com abertura da cavidade abdominal pronto para perfusão do sistema porta hepático.....22
- Figura 3:** Detalhamento de peças plásticas e metálicas descartáveis do kit parasitológico de *TF-Test Quantified*.....24
- Figura 4:** Ovos de *S. mansoni* obtidos pelo emprego de três técnicas parasitológicas. Em **(A)** ovo adquirido pela técnica de *TF-Test Quantified*, com aumento de 40 vezes em microscopia. Em **(B)** ovo adquirido por intermédio da técnica *Helm-Test*, com aumento microscópico de 200 vezes. Em **(C)** ovo obtido pelo exame padrão (*Gold Standard*) com aumento de 40 vezes.....26
- Figura 5:** Etapas do processamento laboratorial para obtenção de parasitos com o uso de técnica de *Helm-Test*.....29
- Figura 6:** Fórmulas utilizadas para avaliação da performance diagnóstica das técnicas parasitológicas.....30
- Figura 7:** Ovos de *S. mansoni* obtidos pelo emprego de três (3) técnicas parasitológicas. Em **(A)** ovo adquirido pela técnica de *TF-Test Quantified*, com aumento de 40 vezes em microscopia; em **(B)** ovo adquirido por intermédio da técnica *Helm-Test*, com aumento microscópico de 20 vezes; em **(C)** ovo obtido por *Gold Standard* com aumento de 40 vezes.....38
- Figura 8:** Ovos de *S. mansoni* obtidos pelo emprego de duas (3) técnicas parasitológicas. Em **(A)** ovo adquirido pela técnica de Kato-Katz, com aumento de 40 vezes em microscopia; em **(B)** ovo adquirido pela mesma técnica parasitológica, porém, com aumento microscópico de 10 vezes; em **(C)** ovo obtido por *TF-Test Conventional* com aumento de 40 vezes; e, em **(D)** ovo adquirido pela mesma técnica parasitológica, porém, com aumento microscópico de 10 vezes.....54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Primeira Bateria de Testes:** Resultados referentes a aplicação do desenvolvimento laboratorial da técnica de *TF-Test Quantified*, com os empregos das metodologias de Coelho *et al.*(2013) e Carvalho *et al.*(2015).....32
- Tabela 2: Segunda Bateria de Testes:** Resultados referentes a aplicação do desenvolvimento laboratorial da técnica de *TF-Test Quantified*, com os empregos das metodologias de Gomes *et al.* (2004) e Lumina *et al.*(2006).....33
- Tabela 3: Terceira Bateria de Testes:** Resultados referentes a aplicação do desenvolvimento laboratorial da técnica de *TF-Test Quantified*, com os empregos das metodologias de Gomes *et al.*(2004) e Lumina *et al.*(2006), à confirmação de resultados da Tabela 2.....35
- Tabela 4: Total de Ovos Detectados (TOD) e Ovos Por Grama (OPG)** de fezes obtidos por cada uma das técnicas parasitológicas.....40
- Tabela 5:** Positividade e tipo de infecção apresentada no estudo de 10 avaliações comparativas entre duas (2) diferentes técnicas parasitológicas.....41
- Tabela 6:** Performance diagnóstica no estudo de duas (2) técnicas parasitológicas.....41
- Tabela 7:** Índice de concordância *Kappa (k)* para diferentes técnicas parasitológicas encontradas em relação a dados de referência.....41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DI: Dias de Infecção

OPG: Ovos Por Grama

TF-Test: *Three Fecal Test*

TOD: Total de Ovos Detectados

TOEPD: Total de Ovos Eliminados Por Dia

TFCPD: Total de Fezes Colhidas Por Dia

WHO: World Health Organization

DAPI: Diagnóstico Automatizado de Parasitos Intestinais

FAD: Flotação por Ar Dissolvido

OMS: Organização Mundial da Saúde

MSB: Ministério da Saúde do Brasil

SBCAL: Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

SPF: Specified Pathogen Free

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 ESQUISTOSSOMÍASE MANSÔNICA	16
1.2 DIAGNÓSTICO QUANTITATIVO	14
2. OBJETIVO	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	20
3.2 INFECÇÃO ANIMAL	21
3.3 COLETA (COLHEITA) DE AMOSTRA FECAL	21
3.4 EUTANÁSIA ANIMAL	22
3.5 FORMAS DE APLICAÇÃO DE BATERIAS EXPERIMENTAIS (TESTES)	23
3.6 FATOR DE CONVERSÃO DA TÉCNICA DE TF-TEST QUANTIFIED	23
3.7 NOVA TÉCNICA PARASITOLÓGICA DE TF-TEST <i>QUANTIFIED</i>	23
3.7.1 PEÇAS PLÁSTICAS E METÁLICAS DESCARTÁVEIS DO <i>KIT TF-TEST</i>	23
3.7.2 PROTOCOLO OPERACIONAL DA TÉCNICA DE <i>TF-TEST QUANTIFIED</i>	24
3.8 TÉCNICA DE <i>HELM-TEST</i>	28
3.9 ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	29
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4. RESULTADOS	30
4.1 IMPORTÂNCIAS DA APLICABILIDADE DE BATERIAS EXPERIMENTAIS (TESTES)	30
4.2 CRIAÇÃO DO FATOR DE CONVERSÃO DA TÉCNICA DE <i>TF-TEST QUANTIFIED</i>	36
4.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE <i>TF-QUANTIFIED</i> E <i>HELM-TEST</i>	37
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DE RESULTADOS	40
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
8. ANEXO	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESQUISTOSSOMÍASE MANSÔNICA

As parasitoses humanas constituem um sério problema de Saúde Pública, apresentam ampla distribuição geográfica no planeta e nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento estão incluídas no rol das doenças negligenciadas. Segundo a *World Health Organization (WHO, em inglês)*, cerca de um bilhão de pessoas no mundo sofrem com estas doenças tropicais, sendo inseridas nesse grupo uma série de parasitoses, as quais dão relevo às principais causas de óbitos em seres humanos (MORRONE *et al.* 2004; PEZZANI *et al.*, 2009; YAMADA *et al.*, 2010; YODER *et al.*, 2010; WHO, b, 2010).

Efetivamente, no globo terrestre entre as doenças parasitárias mais prevalentes estão as esquistossomíases, ou bilharzioses, que propiciam cerca de 200 milhões de indivíduos infectados. Em humanos e animais vertebrados, o gênero *Schistosoma* tem como principais agentes etiológicos as espécies *S. japonicum*, *S. haematobium* e *S. mansoni*, tendo destaque esta última espécie como de grande interesse médico e sanitário em humanos.

A doença (esquistossomíase mansônica, por exemplo) ocasionada por *S. mansoni* é endêmica em aproximadamente 76 países, e estima-se existir mais de 20 milhões (10% do total de infectados) de pessoas desenvolvendo formas severas desta enfermidade (CHITSULO *et al.*, 2000; WHO, a, 2010). Ademais, tem-se em conta de que, no mundo, ocorram anualmente mais de 500.000 óbitos (2,5% das formas severas) devido somente aos agravamentos por esquistossomíase mansônica (WHO, b, 2010). No Brasil, atualmente esta afecção é considerada como endêmica persistente e parece estar presente em 19 unidades federativas, segundo achados do Ministério da Saúde do Brasil (MSB - Secretária de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica) (BRASIL, 2010). Outrossim, de acordo com dados da WHO, avalia-se existir no país cerca de sete milhões de pessoas infectadas por somente esquistossomíase mansônica (WHO, a, 2010).

As manifestações clínicas associadas a essa patologia são em sua maioria resultantes da liberação de grande quantidade de ovos pelas fêmeas adultas acasaladas na corrente sanguínea do hospedeiro definitivo vertebrado, próximo de 150 ovos/dia, o que a faz desencadear reações inflamatórias locais que posteriormente dão origem a tecidos fibrosos (SIQUEIRA, 2011).

Esta doença pode-se mostrar em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda pode ser dividida em fase pré-postural e pós-postural. A fase pré-postural, que ocorre cerca de 10 a 40 dias após a infecção, é caracterizada por coceiras, eritema, febre e frequentemente pode estar associada a tosse, infiltrados pulmonares, dor abdominal e moderada esplenomegalia (REY, 2008; ANDRADE, 2009). Mialgia e eosinofilia também podem ser observadas. Já na fase pós-postural, que perdura entre 40 e 150 dias após a infecção, ocorre à disseminação miliar de ovos e consequente formação de granulomas em diferentes regiões do organismo do hospedeiro vertebrado, observando-se vários quadros sintomatológicos, tais como: emagrecimento, diarreia, hepatoesplenomegalia, enterocolite aguda e alterações discretas nas funções hepáticas (SIQUEIRA, 2011).

Por outro lado, na fase crônica pode ocorrer hepatopatia, enteropatia com hepatomegalia, ascite, diarreia, entre outros sintomas. Em casos mais graves pode haver evolução para hepatomegalia e hipertensão portal, ambos os quadros relacionados como as principais causas de morte por esta afecção parasitária (ANDRADE, 2009; BRASIL, 2010; DOMINGUES *et al.*, 2011).

A complexidade do quadro clínico da esquistossomíase mansônica pode levar a confusão com outras patologias, o que torna o diagnóstico clínico desta enfermidade apenas sugestivo. Por isso, o exame laboratorial é fundamental para a liberação de um diagnóstico conclusivo, definir a conduta terapêutica e realizar o controle de cura desta parasitose. Atualmente, por mostrar simplicidade, eficiência, baixo custo e rapidez, o diagnóstico dessa patologia é feito basicamente por meio do exame parasitológico de fezes (REY, 2008; WHO, a, 2010), apesar de outras modalidades de diagnose ser também empregadas, como por exemplo: eclosão de miracídios; biópsia retal; e métodos imunológicos, como ELISA e Reação Intradérmica (DOMINGUES *et al.*, 2011).

Em rotina de um laboratório de análises clínicas, várias são as técnicas utilizadas de forma qualitativa para a realização do exame parasitológico das fezes, tendo destaque a de sedimentação-espontânea desenvolvida por Lutz (1919) e/ou Hoffman, Pons e Janer (1934). Estima-se que esta técnica seja usada em mais de 90% das rotinas dos laboratórios do nosso país, seja público ou privado (GOMES *et al.*, 2004; BRASIL, 2010; CARVALHO *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2015).

Todavia, à realização de programa de controle da esquistossomíase mansônica, geralmente feitos por meio de políticas governamentais de Saúde Pública, leva-se em consideração a carga parasitária infectante dos indivíduos acometidos por vermes adultos de *S. mansoni*, o que para esta finalidade torna quantitativo o exame das fezes (BRASIL, 2010; WHO, a, 2010; COLLEY *et al.*, 2014). Tal informação laboratorial é obtida por meio da determinação do número de **Ovos Por Grama de fezes (OPG)** nas fezes de um hospedeiro acometido pelo parasito *S. mansoni*. Para esta realização, programas governamentais, sejam nacionais e/ou internacionais, utilizam-se das técnicas convencionais de Kato-Katz (1972) ou de *Helm-Test* (BIOMANGUINHOS, 2010), seguindo determinação da WHO. Entretanto, a literatura relata que o grande problema da primeira técnica (Kato-Katz) reside no fato de deixar a desejar em eficiência diagnóstica, sobretudo em situações de infecções com baixas cargas parasitárias, e em concentrar, quando muito, apenas quatro espécies de helmintos em fezes (KONGS *et al.*, 2001; ENK *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2015).

Por anos, uma técnica qualitativa de alta eficiência diagnóstica é usada em rotina de diversos laboratórios brasileiros, públicos e privados, para o processamento de amostras fecais humanas: *Three Fecal Test (TF-Test)* (GOMES *et al.*, 2004; BRASIL, 2010). É importante mencionar que esta técnica foi resultante de um projeto de pesquisa que recebeu os auspícios da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2004), e atualmente está conveniada sob o número 4225 na Fundação de Desenvolvimento da UNICAMP (FUNCAMP).

Segundo achados da literatura, a técnica de *TF-Test* é capaz de processar de uma só vez três amostras colhidas (coletadas) em dias alternados (dia sim, dia não) e de permitir a concentração ampla de espécies de parasitos, dentre helmintos e protozoários do trato gastrointestinal de humanos e animais vertebrados de pequeno porte (GOMES *et al.*, 2004; LUMINA *et al.*, 2006; GOMES, 2008; CARVALHO *et al.*, 2012, COELHO *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2015; COELHO *et al.*, 2015; INÁCIO *et al.*, 2015). Além disso, esta técnica é capaz de proporcionar esfregaços com quantidades reduzidas de impurezas fecais, facilitando a observação das estruturas parasitárias em lâminas de microscopia.

Vale ressaltar que a alta eficácia laboratorial desta técnica vem permitindo dois avanços científicos e tecnológicos na área da Parasitologia Clínica Humana

nacional e internacional, como: 1. Automatização do Exame Parasitológico das Fezes - DAPI (GOMES, 2008; FAPESP, 2011); e, 2. Estudo e Viabilização de Novos Paradigmas de Concentração e Identificação Parasitária - FAD (FAPESP, 2014; SOARES *et al.*, 2015). Da mesma maneira, progressos científicos vêm sendo proporcionados nos últimos anos por esta técnica parasitológica à área da Medicina Veterinária (LUMINA *et al.*, 2006; COELHO *et al.*, 2013; COELHO *et al.*, 2015; INÁCIO *et al.*, 2015).

Por fim, a atual proposta de trabalho constitui-se em uma extensão do projeto maior *TF-Test*, e tem em vista a validação do diagnóstico quantitativo de ovos de *S. mansoni* em fezes de animais de experimentação, por meio da criação de um protocolo operacional e de um fator de conversão, o que, em etapa posterior de estudo, permitirá medir a eficiência diagnóstica da nova técnica em uma população humana situada em área endêmica para esquistossomíase mansônica.

1.2 DIAGNÓSTICO QUANTITATIVO

Para o diagnóstico laboratorial do parasito *S. mansoni*, a quantificação de ovos nas fezes é um recurso importante, pois, permite estimar a carga média (carga parasitária, p.ex.) deste verme em indivíduos infectados, o que pode auxiliar no acompanhamento e controle de cura de pacientes, além de ser útil ao desenvolvimento, avaliação e validação de novas drogas eficazes para o combate deste agente parasitário (YODER *et al.*, 2010; GRYSEELS, 2012). Por sua vez, do ponto de vista de Saúde Pública, a estimativa da intensidade de infecção deste parasito permite avaliar a probabilidade de transmissão entre indivíduos de uma região endêmica e o impacto das ações de controle em programas governamentais (HALL, 1982; BRASIL, 2010).

Embora a quantificação de ovos desta espécie de parasito da classe trematoda seja uma ferramenta importante em Saúde Pública, diversos fatores podem interferir à obtenção da determinação da quantidade de ovos nas fezes e assim ser determinantes para o sucesso desta modalidade de diagnóstico (KONGS *et al.*, 2001; ENK *et al.*, 2008). Como exemplo, o número de ovos presentes nas fezes pode variar de um dia para o outro, a depender da relação parasito x hospedeiro e, bem como também, estar distribuído em diferentes porções de um mesmo bolo fecal, de maneira heterogênea (ZHANG *et al.*, 2009).

Em uma visão ampla entre helmintos enteroparasitos de humanos e de animais vertebrados, a variação da eliminação de ovos em fezes pode ser dependente de várias causas, tais como: comportamento e espécie de parasito, carga infectante e localização intestinal; e da capacidade imunológica e intensidade do movimento peristáltico intestinal do hospedeiro infectado (STOLL & HAUSHEER, 1926; BELL, 1963; BARBOSA, 1967). Para *S. mansoni*, alguns estudos têm demonstrado certa intermitência na oviposição das fêmeas parasitas e revelado que a presença de ovos dessa espécie nas fezes pode oscilar por influência das vênulas da parede intestinal, especialmente com a doença na fase crônica e o paciente apresentando fibrose intestinal (MARTIN & BEAVER, 1968; HALL, 1981; HALL 1982).

Estudos com animais de experimentação em laboratório sugerem que as fêmeas acasaladas de *S. mansoni* podem eliminar em média cerca de 300 ovos/dia. Porém, aproximadamente metade desses ovos ganha a luz intestinal, atingindo parte da outra metade a circulação venosa (BIOMANGUINHOS, 2010).

A literatura descreve ainda que, a depender da quantidade de alimento ingerida, um indivíduo adulto pode eliminar de 150 a 200 gramas/fezes/dia (CHAVEZ *et al.*, 2004).

Amparando-se nessas conjunturas, com o passar dos últimos anos diversos autores validaram técnicas convencionais consagradas pela literatura científica com a finalidade de quantificar ovos de helmintos parasitos em fezes humanas.

Como exemplo, em 1923, Stoll legitimou uma técnica quantitativa baseada na diluição das fezes em água. Em 1926, Stoll e Hausheer propuseram uma modificação e simplificação dessa mesma técnica com o emprego da diluição das fezes em água e hidróxido de sódio (NaOH). Em 1954, Kato e Miura declararam válida a técnica do esfregaço espesso de celofane para a quantificação de ovos de alguns helmintos do trato intestinal de humanos. Em 1960, Kato sugeriu a modificação e o aperfeiçoamento da mesma técnica parasitológica. Por sua vez, Bell, em 1963, deu validade a uma técnica de quantificação com o emprego de papel de filtro (*Whatman 541*) e funil *Büchner* de porcelana.

Em anos subsequentes, Barbosa, em 1967, propôs a criação de uma técnica de quantificação a partir de uma modificação do princípio laboratorial de

sedimentação-espontânea, descrito em anos anteriores por Lutz (1919) e/ou Hoffman, Pons & Janer (1934). Ainda, Komiya e Kobayashi (1966), Martin & Beaver (1968), Chaia e colaboradores (1968), Katz, Coelho e Pellegrino (1970) tornaram público estudos amparados na técnica parasitológica convencional de Kato. Em 1972, Katz e colaboradores publicaram um estudo propondo a modificação da técnica de Kato, a qual passou a ser chamada de Kato-Katz, que em anos posteriores permitiu a sua ampla aplicação em programas de Saúde Pública, sob a recomendação da *WHO*.

Katz, Coelho e Pellegrino (1970), apoiando-se em estudos realizados com a técnica de Kato, concluíram que em caso de uma infecção mínima por apenas um casal de vermes haveria quase que sempre a presença de um ovo em esfregaço fecal por lâmina de microscopia. Nesta condição, como a técnica de Kato-Katz é capaz de processar cerca de 41,70 mg ($1.000 \text{ g} / 24 = 41,70 \text{ mg}$) de fezes, estabeleceram como critério o fator de conversão de 1/24 para esta técnica parasitológica (SIQUEIRA, 2011; HAILU and ABERA, 2015).

Apesar de ser utilizada mundialmente em programas governamentais para o controle da esquistossomíase mansônica, como comentado em seção anterior, esta técnica se mostra pouco eficiente em situações apresentadas por indivíduos com baixa e moderada intensidade de infecção, talvez, pela perda da eficiência diagnóstica estar relacionada com as condições fisiológicas do parasito e do hospedeiro, e ainda por processar pequena quantidade de material fecal (KONGS *et al.*, 2001; ENK *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2015; HAILU and ABERA, 2015).

Um estudo realizado por ENK e colaboradores, em 2008, concluiu que a leitura em microscopia de apenas uma lâmina processada pela técnica de Kato-Katz, como é usual no Brasil e no restante do mundo, tende a reduzir a quantidade de detecção de ovos *S. mansoni*. Ademais, em rotina laboratorial a técnica de Kato-Katz apresenta outras duas limitações, tais como: impossibilidade de aplicação em fezes diarreicas; e a não detecção de cistos de protozoários (KONGS *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2015; HAILU and ABERA, 2015).

Na tentativa de suprir tais deficiências, alguns autores têm sugerido que a baixa sensibilidade de Kato-Katz pode ser compensada por meio da colheita de

múltiplas amostras de um mesmo paciente em dias diferentes e, por conseguinte, por intermédio do aumento da quantidade de material fecal no processamento laboratorial (ENK *et al.*, 2008). No entanto, ao mesmo tempo estes autores entendem que tais medidas são trabalhosas e dispendiosas para serem aplicadas na vasta rotina dos programas governamentais de controle desta parasitose (ENK *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009).

Mais recentemente, uma nova técnica quantificada vem se destacando em programas governamentais para o controle da esquistossomíase mansônica: *Helm-Test* (BIOMANGUINHOS, 2010). Esta técnica foi apresentada no ano de 2010 por intermédio do Instituto de Tecnologia em Imunológicos (BIOMANGUINHOS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sob o número de registro RE 3490 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil. Com o desenvolvimento baseado na técnica de Kato-Katz, o *Helm-Test* é atualmente recomendado pela *WHO*. Segundo a FIOCRUZ, esta técnica dispensa o uso de água, luz ou qualquer acessório destinado ao preparo de lâminas de microscopia, que podem ser conservadas em temperatura ambiente por até dois (2) anos. Sendo assim, esta técnica permite o exame da lâmina logo após a sua preparação, ou meses depois, quando conservada em ambientes seco, fechado e protegido de insetos, em laboratório. Em vista do apresentado, de acordo ainda com a FIOCRUZ (BIOMANGUINHOS, 2010), esta técnica, quando comparada com a de Kato-Katz, apresenta vantagens, como exemplo: melhor diagnóstico; controle de qualidade das lâminas de microscopia; e, preparo fácil. Isto permite uma identificação mais rápida e menos trabalhosa do diagnóstico de ovos de *S. mansoni*. O Ministério da Saúde do Brasil (MSB), por meio do Biomanguinhos, indica efetivamente esta técnica para o controle e combate da esquistossomíase mansônica. Perante o apresentado, o presente estudo se utilizou da técnica de *Helm-Test* à etapa de validação de quantificação da técnica de *TF-Test*.

Em vista do supracitado, o presente trabalho objetiva desenvolver, avaliar e validar a técnica de *TF-Test* ao diagnóstico quantitativo à detecção de ovos de *S. mansoni*, amparando-se, para isto, em indicações da literatura científica (STOLL & HAUSHEER, 1926; BELL, 1963; BARBOSA, 1967; ARAUJO *et al.*, 2003; LUMINA *et al.*, 2006), de modo permitir em laboratório a determinação da quantidade destes ovos em fezes de animais de experimentação para o conhecimento de Dias de

Infecção (**DI**), **Ovos Por Grama (OPG)**, **Total de Ovos Eliminados Por Dia (TOEPD)** e **Total de Fezes Colhidas Por Dia (TFCPD)**.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver, avaliar e validar a técnica de *TF-Test (Three Fecal Test)* ao diagnóstico quantitativo de ovos do parasito *Schistosoma mansoni*, em comparação com a técnica parasitológica de *Helm-Test*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Infectar animais de experimentação (camundongos, p.ex.) com linhagens, ou variedades, do parasito *S. mansoni*, à aplicabilidade nas etapas de desenvolvimento, avaliação e validação da nova técnica parasitológica;
- Desenvolver uma padronização à determinação da quantidade de ovos de *S. mansoni* à técnica parasitológica de *TF-Test*, por meio do conhecimento de **Dias de Infecção (DI)**, **Ovos Por Grama (OPG)**, **Total de Ovos Eliminados Por Dia (TOEPD)** e **Total de Fezes Colhidas Por Dia (TFCPD)**;
- Avaliar e validar a quantificação da técnica de *TF-Test* em comparação com a técnica de *Helm-Test*; e,
- Investigar a confiabilidade do fator de conversão da nova técnica quantificada de *TF-Test* de forma estatística em termos de parâmetros diagnósticos de sensibilidade e concordância *Kappa* e sua classificação, tais como: *Quase Perfeita*, *Substancial*, *Moderada*, *Fraca* e *Pobre*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

As etapas de desenvolvimento, avaliação e validação da quantificação de ovos de *S. mansoni* pela técnica de *TF-Test Quantified* foi feita por meio de estudos com animais de experimentação. Para isto, foram realizadas quatro (4) baterias de experimentos com um total de 43 camundongos (*Mus musculus*) fêmeas SPF albinos da linhagem *Swiss*, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da UNICAMP. Esses camundongos foram mantidos em caixas plásticas com tampas metálicas e alimentados com ração para animais de laboratório e água “*ad libitum*”.

3.2 INFECÇÃO ANIMAL

Os camundongos foram infectados individualmente aos 30 dias de idade com 70 cercarias da cepa BH de *S. mansoni* oriunda de Belo Horizonte, MG, Brasil, mantidas em moluscos (planorbídeos *Biomphalaria glabrata*) do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP. A escolha do número de cercarias para cada animal (70) foi obtida visando permitir a maior carga parasitária infectante, segundo descrito na literatura científica (BELL, 1963; BARBOSA, 1967).

A infecção parasitária foi feita percutaneamente por meio da técnica de imersão da cauda do animal em solução contendo as cercarias durante duas horas com exposição à luz (**Fig. 1**). Para conter os animais durante esse período foram utilizados dispositivos de suporte e contenção.



Figura 1: Infecção percutânea do camundongo por imersão da cauda em solução contendo cercarias com auxílio de suporte e dispositivo de contenção.

3.3 COLETA (COLHEITA) DE AMOSTRA FECAL

Nas três (3) primeiras baterias de testes, do 45º ao 69º dia de infecção, diariamente, foram colhidas as fezes dos animais de experiência, obtendo-se, assim, um *pool* de todas as fezes eliminadas por todos os camundongos no período de 24 horas. A definição destes dias para obtenção de fezes foi amparada no ciclo biológico do parasito em relação ao hospedeiro, levando em consideração o início (após a sexta semana) e o decréscimo da eliminação de ovos nas fezes desses animais (KATO & MIURA, 1954; BELL, 1963; BARBOSA, 1967; ARAUJO *et al.*, 2003; LUMINA *et al.*, 2006). O *pool* de fezes diárias foi pesado e, posteriormente,

processado em laboratório pela nova técnica parasitológica de *TF-Test Quantified*. Sendo assim, após a aplicação de duas (2) baterias de testes, as quais foram essenciais para o desenvolvimento e avaliação da nova técnica parasitológica, foi possível estimar de maneira segura a determinação de números de ovos encontrados nas fezes dos animais. Segundo indicações da literatura, esta metodologia de trabalho deu oportunidade ao início de um procedimento de quantificação de ovos em fezes destes animais, como por exemplo, com o conhecimento de **Dias de Infecção (DI)**, **Ovos Por Grama (OPG)**, **Ovos Por Dia (OPD)** e **Total de Fezes Coletadas Dia (TFCD)** (ARAUJO *et al.*, 2003; LUMINA *et al.*, 2006).

3.4 EUTANÁSIA ANIMAL

Como praticado por outros autores (KATO & MIURA, 1954; ARAUJO *et al.*, 2003; LUMINA *et al.*, 2006), a eutanásia animal foi aplicada no presente estudo com o intuito de se obter uma estimativa de eliminação de ovos/dia por fêmea (acasalada com macho) de *S. mansoni*, considerando que a literatura estima que uma fêmea é capaz de eliminar 150 ovos dia nas fezes de um animal de experimentação (STOLL, 1923; BELL, 1963; BARBOSA, 1967; ARAUJO *et al.*, 2003; BIOMANGUINHOS, 2010). Sendo assim, no 70^o dia de infecção, cada animal de experimentação foi eutanasiado por meio de deslocamento cervical para a realização da perfusão do sistema porta hepático (**Fig. 2**).



Figura 2: Camundongo eutanasiado com abertura da cavidade abdominal pronto para perfusão do sistema porta hepático.

Os vermes adultos foram recuperados das regiões de interesse e, logo após, colocados em placa de Petri contendo solução salina NaCl 0,85%, sendo posteriormente quantificados e identificados segundo o sexo.

3.5 FORMAS DE APLICAÇÃO DE BATERIAS EXPERIMENTAIS (TESTES)

No presente estudo, como já mencionado no item 3.1, foram realizadas quatro (4) baterias de experimentos (testes). Nas duas baterias iniciais de testes (**Tabelas 1 e 2**), que contou com dez e doze camundongos, respectivamente, um *pool* de fezes diárias foi pesado e, posteriormente, processado em laboratório pela nova técnica parasitológica de *TF-Test Quantified*. Este estudo permitiu obter: a) peso total de fezes eliminadas pelos animais em um período de 24 horas; b) quantidade total de ovos presentes nessas fezes; c) quantidade total de ovos presentes em esfregaço fecal de cada lâmina da nova técnica parasitológica, de um total de cerca de 100 lâminas de microscopia (como descrito em subseção 4.2); e, d) volume padrão estimado de suspensão fecal (1mL) em tubo de centrifugação à nova técnica parasitológica. Em seguida, foram realizadas as terceira e quarta baterias de testes, com o emprego de dez (10) e onze (11) animais, respectivamente. Na quarta bateria foi adicionado um animal sem qualquer tipo de infecção (segundo seção 4, Resultados). Esta bateria de testes foi utilizada à avaliação comparativa entre as técnicas parasitológicas de *TF-Test Quantified* e de *Helm-Test*, como explicado em item 3.6. Na avaliação destas duas técnicas, levamos em consideração o exame padrão (*Gold Standard*), que foi obtido por meio do *pool* de fezes colhidas diariamente. Para isto, deste *pool*, um (1) grama de fezes foi pesado e todo o material passou por leitura de microscopia óptica, para a contagem total de ovos.

3.6 FATOR DE CONVERSÃO DA TÉCNICA DE *TF-TEST QUANTIFIED*

As três (3) baterias de testes iniciais foram essenciais para criar o fator de conversão da nova técnica de *TF-Test Quantified*, como descrito em subseção 4.2 de Resultados (SANTOS *et al.*, 2014).

3.7 NOVA TÉCNICA PARASITOLÓGICA DE *TF-TEST QUANTIFIED*

3.7.1 PEÇAS PLÁSTICAS E METÁLICAS DESCARTÁVEIS DO KIT *TF-TEST*

A nova técnica parasitológica de *TF-Test Quantified* utiliza-se do *kit* da técnica convencional de *TF-Test (Three Fecal Test)*. O mencionado *kit* é constituído por um conjunto de diferentes componentes, ou peças, confeccionados em metal e

plásticos recicláveis como detalhado na Figura 1. O primeiro componente é composto de três tubos, denominados de tubos coletores-usuário, cada um contendo cinco (5) mL de líquido preservador a base de solução neutra de formalina, utilizados para a realização de coleta de material fecal.

No laboratório, os três tubos coletores-usuário contendo amostras fecais são acoplados por encaixe em três orifícios de um sistema duplo de filtros, denominado conjunto de filtros, contendo internamente malhas metálicas filtrantes de 400 μm e 200 μm . Ao conjunto já acoplado, de tubos coletores-usuário com o sistema de filtros, é conectado um tubo de centrifugação. O tubo de centrifugação apresenta-se na forma de cone, com o fundo em forma de “V” em 45°. Por fim, a montagem dos três tubos coletores-usuário, mais conjunto de filtros e tubo de centrifugação, vem a constituir o conjunto processador *TF-Test*.

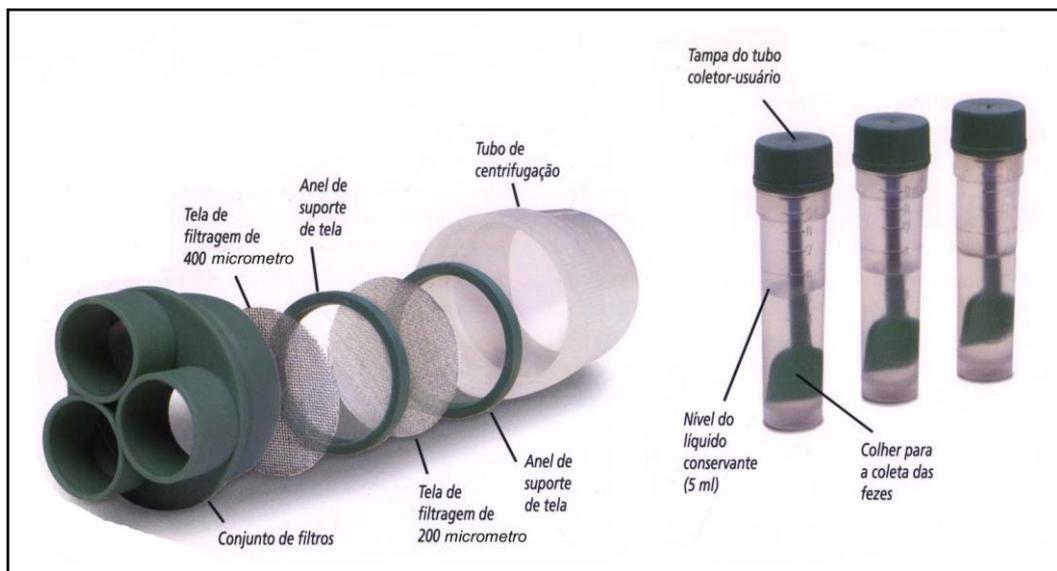


Figura 3: Detalhamento de peças plásticas e metálicas descartáveis do *kit* parasitológico de *TF-Test Quantified*.

3.7.2 PROTOCOLO OPERACIONAL DA TÉCNICA DE *TF-TEST QUANTIFIED*

Após estudos realizados em duas baterias de testes iniciais, foi possível estabelecer um formulário laboratorial à técnica de *TF-Test Quantified*. Sendo assim, o protocolo operacional quantificado desta técnica consiste em:

a) Colher fezes na pazinha plástica do *kit* parasitológico, e pesar cada tubo-coletor usuário em uma **balança analítica de precisão** para a obtenção de **um (1) grama de fezes por tubo**, de um total de três (3) para cada animal;

b) No processamento laboratorial, agitar vigorosamente, de preferência com o uso de *vórtex*, os tubos coletores-usuário contendo as amostras fecais (**Fig. 4, A**), homogeneizando-as para serem processadas;

c) Em uma estante apropriada da técnica parasitológica (**Fig. 4, B**), acomodar os três tubos coletores pertencentes a cada amostra animal, em separado, com as tampas semiabertas. Em seguida, adicionar em cada um dos tubos uma gota de solvente orgânico (detergente neutro incolor) e três (3) mL de acetato de etila p.a.;

d) Fechar os tubos coletores com as suas respectivas tampas e agitá-los vigorosamente por 30 segundos, a fim de obter uma suspensão homogênea de partículas fecais;

e) Retirar as tampas dos tubos coletores, descartando-as em um recipiente apropriado para descarte de material sólido contaminante, seguindo normas de biossegurança;

f) Encaixar os três (3) tubos coletores pertencentes da mesma amostra animal ao conjunto de filtros, que já contém o tubo de centrifugação acoplado em uma de suas extremidades. A unificação de todas essas peças constituirá o conjunto processador *TF-Test Quantified* (**Fig. 4, C**);

g) Verificar se o conjunto processador não apresenta nenhum vazamento de material a ser processado, fazendo para isto a inversão do conjunto;

h) Centrifugar o conjunto processador por dois minutos, a 500 g, tendo os três (3) tubos coletores voltados para a parte superior da caçapa (**Fig. 4, D** - segundo seta) e o tubo de centrifugação voltado para a parte inferior da caçapa. A caçapa utilizada é a de 100 mL universal;

i) Após a centrifugação, desacoplar cuidadosamente do restante das peças do conjunto processador o tubo de centrifugação (**Fig. 4, E**), colocando-o novamente na estante apropriada, descartando o restante das peças em recipiente próprio para material sólido contaminante, seguindo normas de biossegurança;

j) Com o uso de pipeta plástica descartável, decantar o líquido sobrenadante do tubo de centrifugação em recipiente para descarte de 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 centrifugação,

ressuspendendo-o e homogeneizando-o delicadamente com o auxílio de pipeta plástica descartável;

l) O volume de **um (1) mL de suspensão** deve ser estabelecido no tubo de centrifugação (**Fig. 4, F** - conforme seta), seguindo a graduação externa deste mesmo tubo. Em seguida, homogeneizar todo o material com o auxílio de pipeta plástica descartável;

m) Com o auxílio de pipeta graduada, **transferir 50 µl da suspensão fecal** para uma lâmina de microscopia (**Fig. 4, G**);

n) Adicionar sobre este material (suspensão) uma (1) gota de solução de Lugol diluído, e mais uma (1) gota de solução salina fisiológica (NaCl a 0,85%). Preparar, em seguida, um esfregaço de todo o material sobre a lâmina;

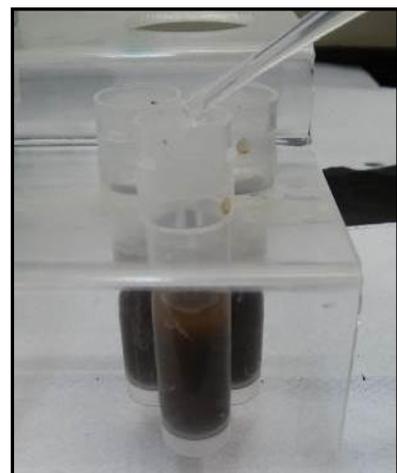
o) Cobrir o esfregaço com lamínula (**Fig. 4, H**) e examiná-lo em microscopia de luz convencional. Todos os ovos contados em uma lâmina devem ser **multiplicados por 20**, fator de conversão da nova técnica de *TF-Test Quantified*; e,

p) Finalizado a leitura microscópica, descartar o tubo de centrifugação com o resto da suspensão de material fecal em um recipiente para material sólido contaminante, como já referido anteriormente.

Seguem imagens do protocolo operacional da técnica de *TF-Test Quantified*.



(A)



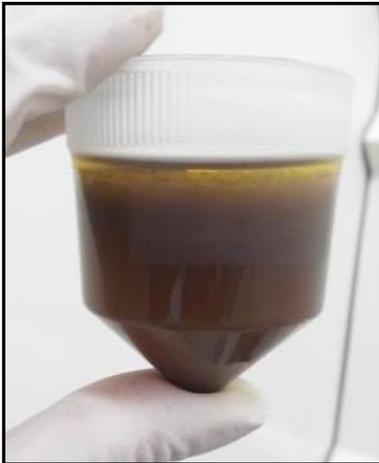
(B)



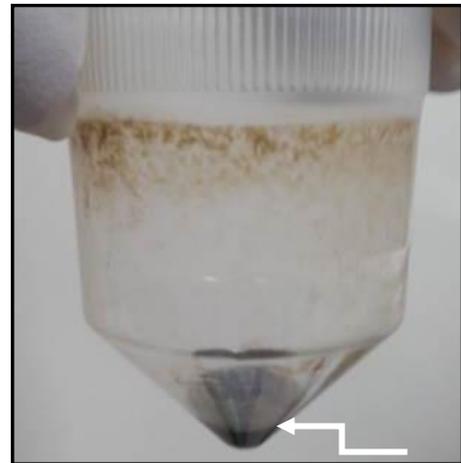
(C)



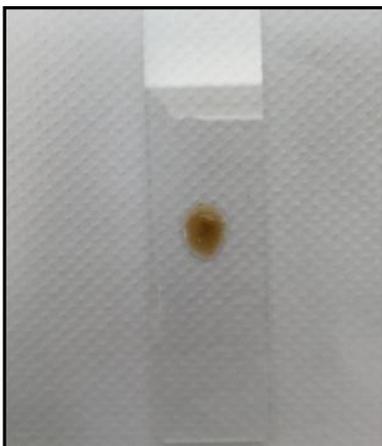
(D)



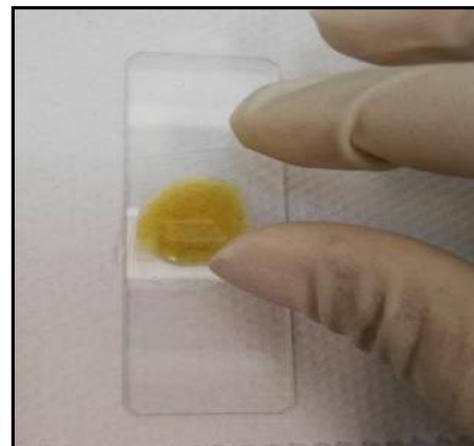
(E)



(F)



(G)



(H)

Figura 4: Etapas do processamento laboratorial para obtenção de parasitos com o uso de técnica de *TF-Test Quantified*.

3.8 TÉCNICA DE *HELM-TEST*

No presente estudo deu-se a preferência em trabalhar a técnica de *Helm-Test* (BIOMANGUINHOS, 2010), por motivos já descritos em subseção 1.2 - Diagnóstico Quantitativo.

Assim, segue abaixo o protocolo laboratorial recomentado à técnica de *Helm-Test* (**Fig. 5, A**):

- a) Retirar uma amostra de fezes com o auxílio da espátula e colocar sobre um papel absorvente;
- b) Depositar sobre as fezes o filtro TEST, comprimindo-a com o auxílio da espátula que fará com que parte das fezes passe através das malhas (**Fig. 5, B**);
- c) Usar o outro lado da espátula para recolher as fezes que passarem pelas malhas e depositar no orifício da placa perfurada que já deverá estar sobre uma lâmina de vidro de microscopia (**Fig. 5, C**);
- d) Comprimir as fezes no orifício da placa perfurada até que esteja cheio;
- e) Passar a lateral da espátula sobre a placa perfurada para retirar o excesso de fezes. Jogar fora a espátula e o filtro TEST;
- f) Levantar, inclinando inicialmente uma das extremidades da placa perfurada e retirá-las de modo a ficar sobre a lâmina de vidro um cilindro do material fecal (**Fig. 5, D**). Jogar fora a placa perfurada;
- g) Colocar sobre o cilindro de fezes a lamínula pré-colorida;
- h) Após ter colocado a lamínula sobre o cilindro de fezes, inverter a preparação sobre uma superfície lisa e fazer pressão com o polegar sobre a região onde se encontra o cilindro de fezes (**Fig. 5, E**), de modo que o material se espalhe uniformemente entre a lâmina e a lamínula (**Fig. 5, F**). Evitar que as fezes extravasem; e,
- i) Levar a preparação ao microscópio para observação e contagem de ovos de helmintos.

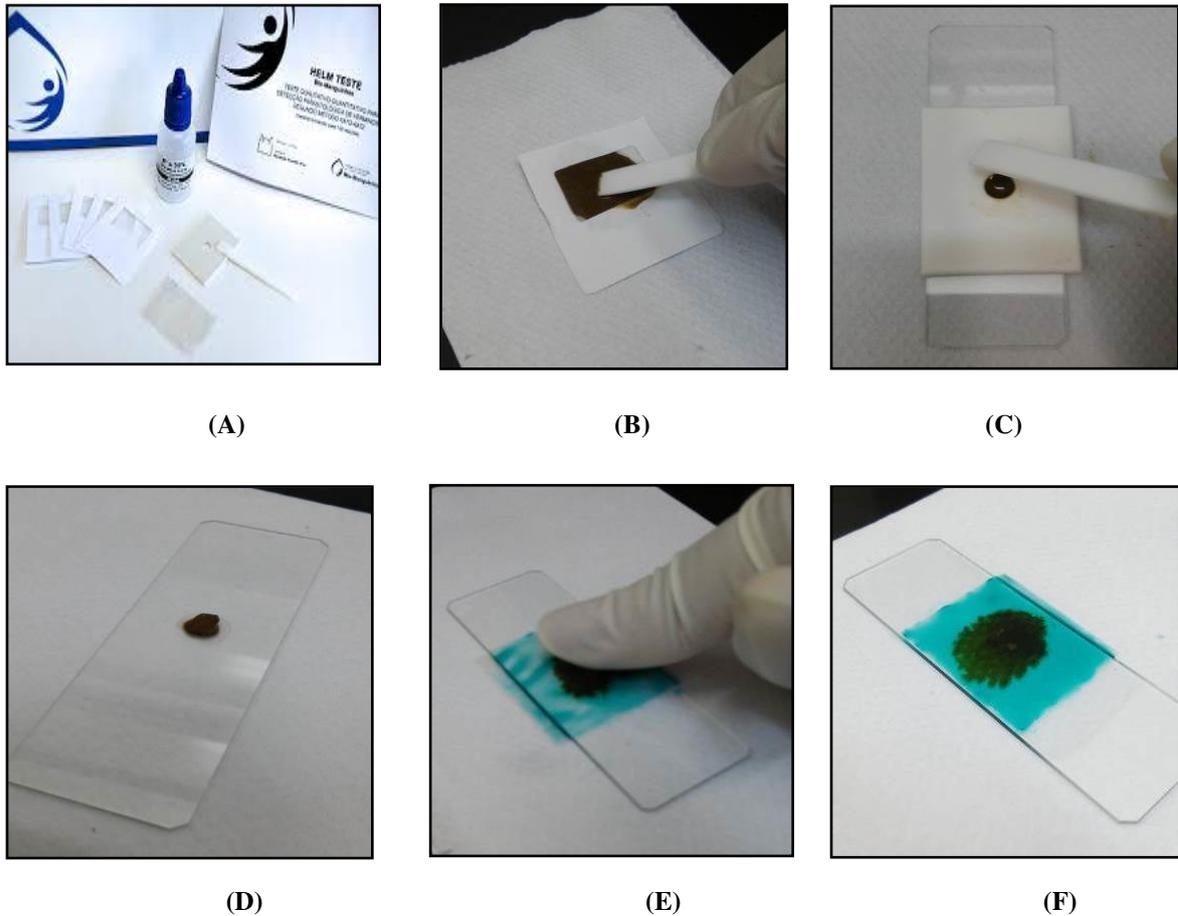


Figura 5: Etapas do processamento laboratorial para obtenção de parasitos com o uso de técnica de *Helm-Test*.

3.9 ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

O atual projeto seguiu rigorosamente os princípios éticos na experimentação de animais adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), que tem como legislação vigente a “Lei Nº 11.794, de 08 de Outubro de 2008”, a qual estabelece procedimentos para o uso de experimentos científicos de animais, e o decreto “Nº 6.899, de 15 de julho de 2009” aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob o protocolo nº 3107-1.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DE RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo foram avaliados estatisticamente por meio de comparações entre as técnicas parasitológicas de *TF-Test Quantified* e *Hem-Test*, determinando para isto parâmetros diagnósticos de sensibilidade (FLEISS, 1981; MACLURE & WILLET, 1987; GALEN & GAMBINO, 1975) e concordância *Kappa* e sua classificação, tais como: *Quase Perfeita*, *Substantial*,

Moderada, Fraca e Pobre (FLEISS, 1981; ROTHMAN & BOICE, 1982; MACLURE & WILLET, 1987; FEINSTEIN, 1985).

Os cálculos utilizados à determinação destes parâmetros diagnósticos seguem abaixo:

		TÉCNICA (A)		
		+	-	
T É C N I C A (B)	+	a	b	e
	-	c	d	f
		g	h	i

PARÂMETROS DIAGNÓSTICOS

Sensibilidade = a/g

Especificidade = d/h

Eficiência = $(a + d) / i$

Valor Preditivo Positivo = a/e

Valor Preditivo Negativo = c/f

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

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

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

$Po = (a + d)/i$

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

Figura 6: Fórmulas utilizadas para avaliação da performance diagnóstica das técnicas parasitológicas.

4. RESULTADOS

4.1 IMPORTÂNCIAS DA APLICABILIDADE DE BATERIAS EXPERIMENTAIS (TESTES)

A tabela um (1) apresenta resultados referentes à primeira bateria de testes com a aplicação do desenvolvimento da técnica de *TF-Test Quantified*. Encontram-se detalhados na tabela 1(A) os Dias de Infecção (DI) dos animais, a contagem do número Total de Ovos Eliminados Por Dia (TOEPD), a contagem do número de Ovos Por Grama (OPG) de fezes de cada um dos dias (cada 24 horas) de infecção do período estudado e o Total de Fezes Colhidas Por Dia (TFCPD). Já na tabela 1(B) encontra-se o número de vermes adultos (machos e fêmeas) recuperados em cada um dos camundongos.

De posse da quantidade de ovos por grama de fezes obtida pela técnica de *TF-Test Quantified*, foi confirmada a existência de perda de concentração de ovos durante o processamento laboratorial da nova técnica parasitológica. Haja vista que,

os resultados da tabela um (1) (**A e B**) mostraram um baixo aproveitamento da nova técnica no quesito quantificação de ovos de *S. mansoni*. Esta primeira bateria (etapa de desenvolvimento) deu indicativos que a técnica de *TF-Test Quantified* necessitaria de passar por melhorias em seu protocolo, especialmente no tocante a concentração de estruturas parasitárias de eliminação (ovos). Todavia, havia dúvida em fazer alguma afirmação neste sentido, pois, tínhamos também suspeita da carga infectante dos animais, devido se tratar do primeiro teste.

Segundo resultados da tabela 1(**B**), a atual bateria foi capaz de propiciar a eliminação média de somente 8,59 ovos por grama de fezes (**Tabela 1, A**), e a nova técnica não concentrava mais do que dois (2) ovos por lâmina de microscopia, muito abaixo da expectativa, principalmente quando comparado com o atual TOD (**Tabela 4**). É importante ressaltar que nesta bateria de testes utilizamo-nos, de maneira quantitativa, dos princípios técnicos laboratoriais da técnica qualitativa modificada de *TF-Test* (COELHO *et al*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2015).

Após alterações feitas no fator de conversão da nova técnica de *TF-Test Quantified*, como exemplo, mudança da padronização do volume líquido do tubo de centrifugação e resgate de amostra fecal para lâmina de microscopia, nos amparando para isto na técnica qualitativa convencional de *TF-Test* (GOMES *et al.*, 2004; LUMINA *et al.*, 2006), foi realizada a segunda bateria de testes com 12 animais.

Tabela 1, Primeira Bateria de Testes: Resultados referentes a aplicação do desenvolvimento laboratorial da técnica de *TF-Test Quantified*, com os empregos das metodologias de Coelho *et al.*(2013) e Carvalho *et al.*(2015).

Dias Infecção	Nº Ovos	Total de Fezes Colhida (G)	Ovos por Grama (OPG)
45	148	34,26	4,32
46	194	37,40	5,19
47	233	35,27	6,61
48	228	32,15	7,09
49	237	38,56	6,15
50	220	29,87	7,37
51	259	33,91	7,64
52	235	36,65	6,41
53	282	31,34	9,00
54	301	37,41	8,05
55	287	39,17	7,33
56	243	40,73	5,97
57	341	38,54	8,85
58	335	36,80	9,10
59	382	31,75	12,03
60	409	38,42	10,65
61	416	36,97	11,25
62	402	40,05	10,04
63	407	34,08	11,94
64	401	30,80	13,02
65	368	32,69	11,26
66	354	36,58	9,68
67	329	37,43	8,79
68	331	41,22	8,03
69	322	35,26	9,13
Média	306,56	35,89	8,59

(A)

Número de vermes adultos		
Camundongo	Machos	Fêmeas
1	10	7
2	12	9
3	25	12
4	15	14
5	25	17
6	19	26
7	34	21
8	5	3
9	23	19
10	16	5
Total	184	133

(B)

Desta vez, os resultados foram bem mais satisfatórios (**Tabela 2, A e B**), sobretudo por estas melhorias resultarem em boa concentração de estruturas parasitárias para a nova técnica, como exemplo, ao passar concentrar em média 23,99 ovos por grama de fezes (**Tabela 2, A**). Independentemente dos resultados favoráveis proporcionados na segunda bateria de testes, diferentemente da literatura científica, concluímos que os dias bons de eliminação de ovos, com boa concentração, subtenderam em média do 54^o ao 69^o dia, de acordo com coloração

da Tabela 2, A., e não do 45º ao 69º dia como referenciado por autores literários (KATO & MIURA, 1954; BELL, 1963; BARBOSA, 1967; ARAUJO *et al.*, 2003).

Tabela 2, Segunda Bateria de Testes: Resultados referentes a aplicação do desenvolvimento laboratorial da técnica de *TF-Test Quantified*, com os empregos das metodologias de Gomes *et al.*(2004) e Lumina *et al.*(2006).

Dias Infecção	Nº Ovos	Total de Fezes Coletadas (G)	Ovos por Grama (OPG)
45	454	36,76	12,35
46	550	38,6	14,25
47	671	34,98	19,18
48	694	37,06	18,73
49	718	39,91	17,99
50	654	38,2	17,12
51	793	38,92	20,38
52	688	37,85	18,18
53	841	39,9	21,08
54	912	38,51	23,68
55	898	38,1	23,57
56	720	37,33	19,29
57	1035	38,34	27,00
58	1001	37,02	27,04
59	1116	38,53	28,96
60	1235	39,74	31,08
61	1260	39,51	31,89
62	1219	37,75	32,29
63	1207	40,78	29,60
64	1217	38,14	31,91
65	1111	39,55	28,09
66	1037	36,64	28,30
67	987	37,05	26,64
68	979	37,3	26,25
69	989	39,72	24,90
Média	919,44	38,25	23,99

(A)

Número de vermes adultos		
Camundongo	Machos	Fêmeas
1	14	9
2	17	9
3	23	15
4	23	8
5	18	5
6	16	13
7	20	2
8	4	2
9	12	11
10	15	9
11	49	30
12	21	7
Total	232	120

(B)

Em uma próxima bateria de testes (terceira bateria), trabalhamos mais dez (10) animais de experimentação visando atingir valores mais confiáveis e, como também, possibilitar a confirmação do fator de conversão à técnica de *TF-Test Quantified*. Com isto, foi possível estimar o **OPG** desta nova técnica com padronizações no seu protocolo operacional, como exemplo: com a pesagem de

amostras coletadas em balança analítica (1 grama); com a padronização de um volume de suspensão fecal (1mL) em tubo de centrifugação; com a padronização da retirada (50 µl) de suspensão fecal processada em tubo de centrifugação para preparação de esfregaço em lâmina de microscopia; e, por último, com o estabelecimento de um fator de conversão (1/20), ao multiplicar por 20 cada ovo detectado em lâmina de microscopia.

Esses resultados mostraram-se mais consistentes (30,56 ovos por grama) pelo fato de apresentar 58 fêmeas a mais que a bateria anterior ($178 - 120 = 58$), porém, compatíveis com o observado no experimento anterior, sobremaneira quando passamos a nos aproveitar das fezes após o 54º dia de infecção animal.

Tabela 3, Terceira Bateria de Testes: Resultados referentes a aplicação do desenvolvimento laboratorial da técnica de *TF-Test Quantified*, com os empregos das metodologias de Gomes *et al.*(2004) e Lumina *et al.*(2006), à confirmação de resultados da Tabela 2.

Dias Infecção	N° Ovos	Total de Fezes Coletadas (g)	Ovos por Grama (OPG)
45	640	38,15	16,78
46	654	39,47	16,57
47	798	37,24	21,43
48	825	38,88	21,22
49	854	30,94	27,60
50	778	39,75	19,57
51	943	39,69	23,76
52	818	38,51	21,24
53	999	30,25	33,02
54	1085	31,29	34,68
55	1068	30,63	34,87
56	856	36,42	23,50
57	1231	37,75	32,61
58	1191	39,39	30,24
59	1328	32,27	41,15
60	1469	31,56	46,55
61	1499	38,11	39,33
62	1450	39,68	36,54
63	1436	30,94	46,41
64	1448	37,83	38,28
65	1322	38,12	34,68
66	1234	39,35	31,36
67	1174	38,47	30,52
68	1165	37,61	30,98
69	1176	37,92	31,01
Média	1097,64	36,41	30,56

(A)

Número de vermes adultos		
Camundongo	Machos	Fêmeas
1	21	19
2	35	24
3	26	15
4	18	17
5	12	9
6	16	23
7	28	26
8	14	12
9	29	20
10	16	13
Total	215	178

(B)

4.2 CRIAÇÃO DO FATOR DE CONVERSÃO DA TÉCNICA DE *TF-Test Quantified*

As três (3) baterias de testes iniciais foram necessárias para desenvolver e avaliar a desenvoltura da nova técnica de *TF-Test Quantified* (SANTOS *et al.*, 2014). Ainda, estas etapas de trabalho permitiram criar um fator de conversão para a nova técnica parasitológica, com alta eficiência diagnóstica (**Tabela 4**). Para a confirmação desta realização, 100 lâminas de microscopia foram processadas por fezes obtidas dos animais e analisadas minuciosamente, por meio da contagem total de ovos de cada lâmina, tendo em vista obter a concentração média de ovos por uma lâmina. Como exemplo, em cada uma das 100 lâminas, processadas pela nova técnica parasitológica, foi realizada a leitura total dos ovos presentes em esfregaço fecal (50 μ L). Com isto, foi praticável estimar a detecção média de cinco (5) ovos por lâmina pela técnica de *TF-Test Quantified*, ficando muito próximo do estudo de validação demonstrado em avaliação comparativa entre técnicas da Tabela 4 (**TOD** = média de 4,54 ovos por lâmina). Convém esclarecer que uma linha de raciocínio quase que parecida foi estabelecida por Kato (1960), com a determinação média de um (1) ovo por lâmina para a técnica de Kato, efetivamente nomeada de Kato-Katz.

Para a criação do fator de conversão, foram estabelecidas as seguintes considerações: a) capacidade de processamento fecal da nova técnica parasitológica, de um total de três (3) gramas de fezes, ou seja, um (1) grama de fezes para cada tubo coletor após pesagem por balança analítica; b) processamento laboratorial deste material que resulta em uma suspensão fecal, a qual foi padronizada em um volume de um (1) mL (1000 μ L), utilizando, para isto, a decantação de material em excesso no tubo de centrifugação; e, c) resgate desta suspensão, com auxílio de pipeta graduada, de 50 μ L para a preparação de lâmina de microscopia. Assim, foi padronizado um fator de conversão de 1/20 (1.000 μ L /50 μ L) à nova técnica de *TF-Test Quantified*. Nesta condição, todos os ovos detectados em uma lâmina por esta nova técnica passaram a ser multiplicados por 20 (número de ovos x 20, por exemplo). Como 1000 μ L resultantes do processamento desta técnica correspondem a três (3) gramas de fezes, e o resultado deve ser expresso em **OPG**, o valor obtido após a multiplicação pelo fator de conversão passou a ser dividido por três (3) (**Tabela 4**).

Em vista do apresentado, de acordo com a tabela 4 (bateria final de testes), a próxima etapa do trabalho foi realizar um último experimento com o

objetivo de comparar as técnicas quantificadas de *TF-Test Quantified* e *Helm-Test*, utilizando ainda a contagem total de ovos presentes em um (1) grama de fezes como padrão, ou como exame *Gold Standard*. Convém esclarecer que a técnica de *Helm-Test* pressupõe a leitura de uma lâmina de microscopia, como à técnica de *TF-Test Quantified*. Desta maneira, para definir a quantidade de ovos por grama de fezes na técnica de *Helm-Test*, o número **Total de Ovos Detectados (TOD)** em uma lâmina deve ser multiplicado pelo fator de conversão 24.

4.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE *TF-TEST QUANTIFIED* E *HELM-TEST*

Após as realizações das etapas de desenvolvimento e avaliação da técnica de *TF-Test Quantified*, em que foram aproveitadas as três (3) baterias de testes iniciais, foi realizada uma quarta bateria experimental com onze (11) animais, a fim de comparar a eficiência diagnóstica da nova técnica com a de técnica de *Helm-Test*, tendo como referência o Exame Padrão. Convém esclarecer que o décimo primeiro animal foi acrescido neste estudo sem nenhum tipo de infecção para a aplicação do índice *Kappa (k)*, que permite avaliar somente casos positivos e negativos (FLEISS, 1981; MACLURE & WILLET). Ou seja, não existe estudo de avaliação estatística sem que ocorram resultados positivos e negativos entre as técnicas de diagnóstico.

Utilizando o mesmo procedimento descrito nas subseções 3.2 e 3.3, os camundongos foram infectados e, porém, nesta etapa demos preferência em colher as fezes diariamente do 55° ao 64° dia de infecção, para as realizações de dez (10) avaliações comparativas entre as supracitadas técnicas parasitológicas (**Tabela 4**).

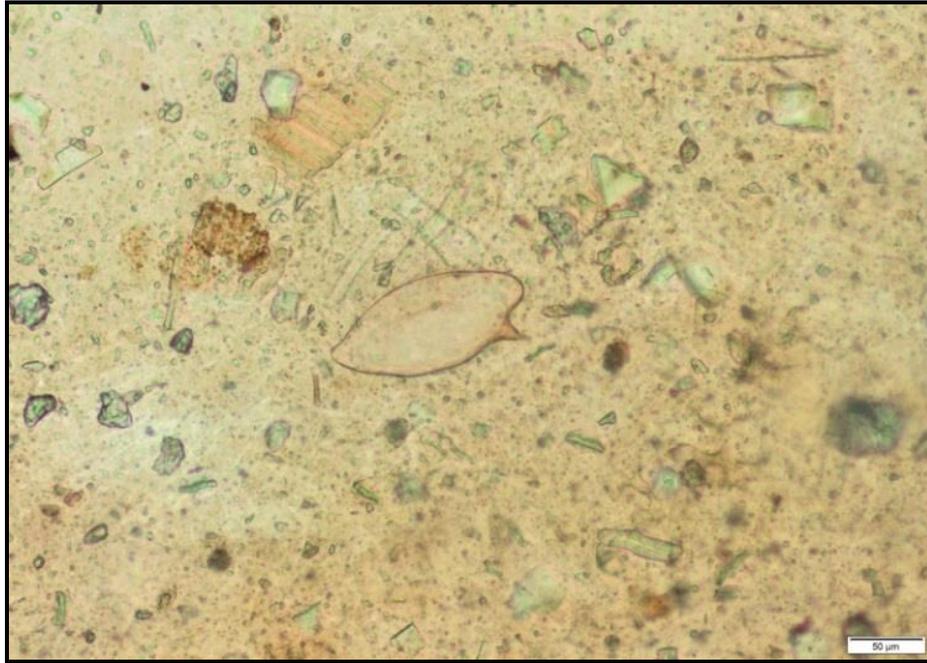
Assim, a partir do total (*pool*) de fezes colhidas em cada dia, foram aproveitadas 41,70 mg para o processamento laboratorial da técnica de *Helm-Test*, resultando em uma lâmina de microscopia para leitura. Ainda, desse mesmo *pool* foram pesadas três (3) gramas de fezes para realização da técnica de *TF-Test Quantified*, sendo adicionado exatamente um (1) grama em cada um dos três (3) tubos coletores do *kit TF-Test*, com o auxílio de balança analítica. O material foi processado segundo protocolo descrito em subseção 3.5.1, o que resultou em um (1) mL de suspensão no tubo de centrifugação. Essa suspensão foi homogeneizada e uma alíquota de 50 µL deste meio foi transferida para uma lâmina de microscopia para a leitura em microscopia.

Ainda, para a realização do *Gold Standard*, a partir do mesmo *pool* do dia foi pesado um (1) grama de fezes, que posteriormente foi homogeneizado com auxílio de algumas gotas de água. Dessa suspensão foram preparadas lâminas de microscopia (em média 18 lâminas) para a leitura de todo volume de fezes em microscópio à obtenção da contagem total de ovos.

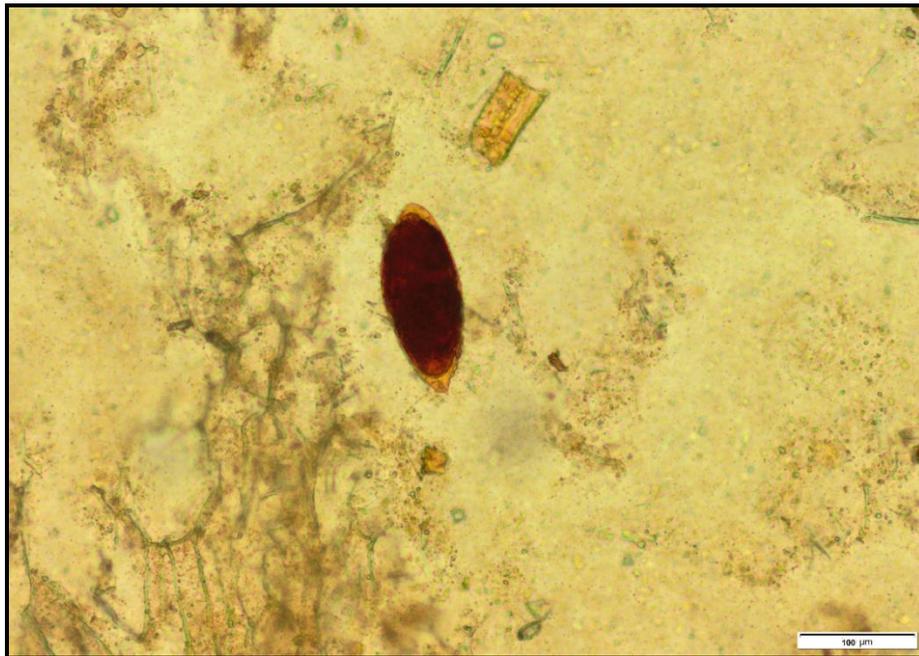
A figura 7 mostra imagens de ovos de *Schistosoma mansoni* obtidos por meio das três técnicas comparadas. Em (A) o ovo foi obtido pela técnica de *TF-Test Quantified*, em (B) pela técnica de *Helm-Test* e em (C) pelo exame considerado *Gold Standard*.



(A)



(B)



(C)

Figura 7: Ovos de *S. mansoni* obtidos pelo emprego de três (3) técnicas parasitológicas. Em (A) ovo adquirido pela técnica de *TF-Test Quantified*, com aumento de 40 vezes em microscopia; em (B) ovo adquirido por intermédio da técnica *Helm-Test*, com aumento microscópico de 20 vezes; em (C) ovo obtido por *Gold Standard* com aumento de 40 vezes.

Seguem, em Tabela 4, os números comparativos do Total de Ovos Detectados (TOD) e Ovos Por Grama (OPG) de fezes obtidos por cada uma das técnicas parasitológicas.

Tabela 4: Total de Ovos Detectados (TOD) e Ovos Por Grama (OPG) de fezes obtidos por cada uma das técnicas parasitológicas.

Avaliação Comparativa	<i>Helm-Test</i>		<i>TF-Test Quantified</i>		<i>Gold Standard</i> (1 grama)
	Total de Ovos Detectados (TOD)	Ovos Por Grama (TOD X 24)	Total de Ovos Detectados (TOD)	Ovos Por Grama (TOD X 20/3)	
1	0	0	4	26,66	31
2	1	24	5	33,33	38
3	1	24	5	33,33	36
4	2	48	4	26,66	37
5	1	24	6	40	43
6	1	24	7	46,66	51
7	2	48	4	26,66	32
8	0	0	4	26,66	35
9	1	24	5	33,33	42
10	2	48	6	40	49
11	0	0	0	0	0
Média	1,0	24,0	4,54	30,30	35,82

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DE RESULTADOS

O avanço de conhecimentos vem promovendo com o passar dos anos o desenvolvimento e a validação de novas técnicas diagnósticas. Estas, todavia, segundo a literatura científica, deverão ser adequadamente avaliadas e validadas quanto às suas características antes de serem utilizada de rotina em laboratórios (GALEN & GAMBINO, 1975; FLEISS, 1981; ROTHMAN & BOICE, 1982; MACLURE & WILLET, 1987; FEINSTEIN, 1985).

Para isto, várias ferramentas estatísticas são utilizadas, sendo os parâmetros mais avaliados: sensibilidade, especificidade, eficiência, valor preditivo de resultado positivo e de resultado negativo, resultados falsos positivos e falsos negativos. Estes parâmetros são determinados em relação ao diagnóstico verdadeiro, onde os agentes causadores de uma doença e/ou técnicas diagnósticas são diretamente demonstrados. Assim, apesar do baixo número de avaliação comparativa entre técnicas, os cálculos preliminares para a determinação de tais

parâmetros do atual estudo seguem abaixo, os quais pretendemos ampliar em um próximo estudo de campo (interlaboratorial) com população humana localizada em área endêmica para esquistossomíase mansônica:

Tabela 5: Positividade e tipo de infecção apresentada no estudo de 10 avaliações comparativas entre duas (2) diferentes técnicas parasitológicas.

Técnicas	Positividade	Total
<i>TF-Test Quantified</i>	10	10
<i>Helm-Test</i>	8	8

De acordo com Tabela 5, a técnica quantificada de *TF-Test*, diferentemente da técnica de *Helm-Test*, apresentou 100% de positividade se equiparando, com isto, com o Exame Padrão (**Tabela 4**).

Tabela 6: Performance diagnóstica no estudo de duas (2) técnicas parasitológicas.

Técnicas	Sensibilidade	Eficiência
<i>TF-Test Quantified</i>	0,10 ou 100% (10/10)	1 ou 100%
<i>Helm-Test</i>	0,8 ou 80% (08/10)	0,82 ou 82%

Da mesma forma anterior, a nova técnica parasitológica mostrou-se mais sensível e eficaz que a técnica de *Helm-Test*, se equiparando novamente com o Exame Padrão.

Tabela 7: Índice de concordância *Kappa* (*k*) para diferentes técnicas parasitológicas encontradas em relação a dados de referência.

Técnicas	<i>Kappa</i> (<i>k</i>)	Rank
<i>TF-Test Quantified</i>	1,00 ou 100%	Quase Perfeita
<i>Helm-Test</i>	0,42 ou 42%	Moderada

Em relação à concordância *Kappa* (*k*) e sua classificação, as duas (2) técnicas apresentaram os seguintes resultados quando avaliadas comparativamente de forma estatística com o Exame Padrão:

TF-Test Quantified

Número de acordos de observados: 11 (100% das observações);

Número de acordos esperados pelo acaso: 9,200 (83,47% das observações);

Kappa = 1,000 (100%);

Cálculo realizado com 95% de intervalo de confiança: de 1,000 para 1,000; e,

A força de acordo foi considerada como “*Quase Perfeita*”.

Helm-Test

Número de acordos observados: 9,000 (81,82% das observações);

Número de acordos esperados pelo acaso: 7,500 (68,60% das observações);

Kappa = 0,421 (42,10%);

Cálculo realizado com 95% de intervalo de confiança: de - 0,171 para 1,000

A força de acordo foi considerada como “*Moderada*”.

5. DISCUSSÃO

As três (3) baterias iniciais de experimentação (teste) foram de extrema importância para a aplicabilidade do atual estudo. Foi por meio destas baterias que conseguimos adequar (desenvolver e avaliar) a quantificação da nova técnica parasitológica, nos amparando em estudos realizados por outros autores com a técnica de *TF-Test* (GOMES *et al.*, 2004; LUMINA *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2012; COELHO *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2015; INÁCIO *et al.*, 2015).

Nestas baterias iniciais, visando criar o fator de conversão da nova técnica de *TF-Test Quantified*, foram estabelecidas algumas definições de siglas de grande utilidade para a aplicação no estudo, como exemplo: **DI** = **D**ias de **I**nfecção animal; **TOEPD** = **T**otal de **O**vos **E**liminados **P**or **D**ia; **O**vos **P**or **G**rama de fezes = **OPG**; e **T**otal de **F**ezes **C**olhidas **P**or **D**ia = **TFCPD**. Igualmente, estas baterias foram importantes à obtenção da eutanásia animal, visando controlar o grau de infecção (carga parasitária) animal por meio da eliminação de ovos/dia/fêmea, e à leitura das 100 lâminas de microscopia processadas à avaliação quantitativa da nova técnica parasitológica.

A primeira bateria de experimento apontou baixa concentração de ovos obtidos pelo processamento laboratorial da nova técnica parasitológica. Nesta bateria, demos preferência em aplicar o princípio laboratorial proporcionado por Coelho e colaboradores (2013) e Carvalho e colaboradores (2015). A média de ovos por grama de fezes concentrada por este princípio técnico não superou a 8,59,

ficando muito aquém da expectativa. Ainda no uso deste procedimento técnico, as leituras feitas em lâminas de microscopia mostraram baixa concentração de ovos, não superando a dois (2) por lâmina, e/ou 2,3 ovos por fêmea/média (306,56/133). A princípio, havia dúvida em fazer alguma afirmação quanto a esta perda diagnóstica, pois, tínhamos também dúvidas da carga infectante dos animais e da eliminação de ovos por 133 fêmeas acasaladas por machos de *S. mansoni* (**Tabela 1**). Especialmente levando em consideração os relatos da literatura científica que indicam que uma fêmea desta espécie parasitária é capaz de eliminar cerca de 150 ovos por dia na luz intestinal de um animal de experimentação (BIOMANGUINHOS, 2010).

Diante dos problemas acima mencionados, aplicamos uma segunda bateria de experimento, desta vez, nos amparando em estudos realizados por Gomes e colaboradores (GOMES *et al.*, 2004) e Lumina e colaboradores (LUMINA *et al.*, 2006). Nesta etapa de trabalho, diferentemente do referenciado por autores literários (KATO & MIURA, 1954; BELL, 1963; BARBOSA, 1967; ARAUJO *et al.*, 2003), que recomendam do 45º ao 69º dia para uma boa colheita de ovos de *S. mansoni* em animais de experimentação, passamos colher ovos do 54º ao 69º dia de infecção animal, como demonstrado em Tabelas 2 e 3 (linhas coloridas). Na nossa experiência, estes dias proporcionaram na média quase que o dobro de eliminação de ovos, especialmente quando comparado principalmente com a primeira semana de eliminação (45º ao 50º dia) (**Tabelas 2 e 3**). Esta etapa de trabalho permitiu ainda estimar o **OPG** para a técnica de *TF-Test Quantified*, com o estabelecimento de um fator de conversão para esta técnica de 20 vezes (20 x cada ovo diagnosticado por uma lâmina). Ainda nesta etapa foi possível concentrar quase 2,8 vezes mais ovos (23,99 por grama de fezes), ante a primeira bateria (8,59 ovos por grama de fezes), mesmo com 13 fêmeas acasaladas a menos (133 - 120 = 13) (**Tabelas 2 e 3**). Isto deu indicativos de que a nova técnica se mostrou mais eficaz com as modificações efetuadas, pois, mesmo com a redução do número de fêmeas acasaladas por machos, a técnica foi capaz de quase triplicar a concentração de ovos em lâmina de microscopia.

Assim, estendemos o nosso estudo à terceira bateria de testes, que apresentou resultados próximos da segunda bateria. Porém, desta vez, esta bateria (terceira bateria) foi capaz de concentrar em média mais 6,57 ovos por grama de

fezes ($30,56 - 23,99 = 6,57$), ante a segunda bateria. Para isto, tinha-se uma explicação: a terceira bateria mostrou 58 fêmeas a mais acasaladas com machos ($178 - 120 = 58$), o que certamente fez esta bateria concentrar mais **Ovos Por Grama de fezes (OPG)**.

Com a aplicabilidade destas três (3) baterias, o fator de conversão da nova técnica quantificada passou a mostrar boa estabilidade diagnóstica, com a estabilização média de cinco (5) por lâmina confirmada no estudo com as 100 lâminas de microscopia. Isto comprovou que os princípios técnicos laboratoriais validados por Gomes e colaboradores (2004) e Lumina e colaboradores (2006) foram mais eficientes para o nosso estudo, sobremaneira por aplicarem concentração parasitária com o uso da centrifugo-sedimentação em solução neutra de formalina, diferentemente de Coelho e colaboradores (2013) e Carvalho e colaboradores (2015), que se aproveitaram mais do princípio de flutuação-espontânea com o uso de solução de alta densidade específica (sulfato de zinco).

Sendo assim, o fator de conversão da nova técnica foi obtido pela inclusão do princípio laboratorial da técnica convencional de *TF-Test* (GOMES *et al.*, 2004; LUMINA *et al.*, 2006), por meio da correta pesagem (1 grama) de amostra fecal com o uso de balança analítica de precisão, da padronização da obtenção de 1 mL de suspensão fecal em tubo de centrifugação da mencionada técnica, e do resgate de 50 μ L desta suspensão para a preparação de lâmina de microscopia.

Em uma última etapa de bateria (quarta bateria), utilizamo-nos à comparação entre técnicas a análise estatística não paramétrica de dados qualitativos empregando o índice *Kappa* (*k*). Considerando que este índice é capaz de indicar o grau de concordância existente entre dados qualitativos, positivos e negativos, obtidos por diferentes técnicas de diagnóstico (FLEISS, 1981; MACLURE & WILLET). Entretanto, pelo fato da dificuldade de se manter um grande número de animal de experimentação em laboratório, a avaliação deste estudo não pôde se aproveitar de um número de animais adequado à aplicação da avaliação estatística entre técnicas parasitológicas (mínimo de 50 resultados positivos entre técnicas). Com isto, nesta etapa de trabalho aproveitamos somente de onze (11) avaliações comparativas com o uso de dez (10) animais com infecção e um (1) sem qualquer infecção parasitária. Esta avaliação foi curta, pois, a literatura indica que este tipo de estudo deve ser aplicado em indivíduos diferentes, e não em repetição dos mesmos

indivíduos (KATO & MIURA, 1954; BELL, 1963; BARBOSA, 1967; ARAUJO *et al.*, 2003; LUMINA *et al.*, 2006).

A técnica de *TF-Test Quantified*, diferentemente da técnica de *Helm-Test*, mostrou com clareza as estruturas dos ovos do parasito em estudo com boas qualidades morfométricas (**Figura 6, A**), com campo de imagem apresentado baixa concentração de impurezas fecais. Esta condição facilitou a identificação dos ovos de *S. mansoni*. Isto será de extrema importância para a realização de estudos futuros no campo, no qual nos aproveitaremos de um número grande de fezes humanas, as quais, segundo achados de Carvalho e colaboradores (2015), mostram-se mais impuras que as fezes animais (**Figuras 8, Anexo**). Da forma apresentada por *Helm-Test* (**Figura 6, B**), esta técnica não se mostrou apta para o controle de cura, devido ao fato da sua clarificação, com uso de reagente, desintegrar as estruturas internas dos ovos de *S. mansoni*.

Apesar do baixo número de casos comparativos, os resultados apresentados em Tabela quatro (4) confirmam que foi conciso o fator de conversão, aonde o número médio de ovos por grama (**OPG** = 30,30) obtido por *TF-Test Quantified* esteve muito próximo do observado no *Gold Standard* (**OPG** = 35,82), diferentemente da técnica de *Helm-Test* (**OPG** = 24,00). Da mesma forma, o fator de conversão da nova técnica se aproximou muito dos resultados médios de **OPG** obtido pelas Tabelas 2 e 3, que a partir do 54^o detectaram em média 27,50 e 35,17 ovos/grama/fezes, respectivamente. Ademais, a técnica de *TF-Test Quantified* foi capaz de detectar as infecções de todos os animais, como o *Gold Standard*, ao contrário da técnica de *Helm-Test*, que resultou dois exames falsos negativos e em mais cinco exames muito próximos do erro diagnóstico (1 ovo por lâmina) (**Tabela 4**).

Resultados similares e favoráveis para a técnica de *TF-Test* em relação *Kato-Katz* foram demonstrados em diferentes estudos autorais (GOMES *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2015). Da mesma maneira, porém, com a utilização de diversas técnicas parasitológicas, outros autores realizaram estudos comparativos demonstrando a moderada e baixa sensibilidade de *Kato-Katz* (CALDEIRA *et al.*, 2012, NIKOLAY *et al.*, 2014, SPEICH *et al.*, 2014; HAILU and ABERA, 2015).

Como exemplo, no ano de 2015, HAILU e ABERA realizaram uma avaliação da performance diagnóstica do Exame Direto em comparação com as técnicas parasitológicas de Kato-Katz e Concentração Formol-Éter Etilico (Ritchie, 1948) por meio do exame de 778 amostras fecais humanas. Neste estudo, o Exame Direto mostrou sensibilidade diagnóstica de 61,10%, enquanto que as técnicas de Kato-Katz e Formol-Éter Etilico obtiveram sensibilidades de 58,70% e 92,30%, respectivamente.

É importante ressaltar que, de acordo com achados da literatura (KONGS *et al.*, 2001; ENK *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2015; HAILU and ABERA, 2015), talvez, a perda de sensibilidade da técnica de *Helm-Test*, que ampara-se na metodologia de Kato-Katz, se deve a pequena quantidade de fezes processada em laboratório (41,70 mg), sem nenhum tipo de concentração parasitária. Na nossa realidade, a nova técnica foi capaz de concentrar cerca de 72 vezes mais fezes ($3.000 \text{ mg} / 41,70 \text{ mg} = 84$) do que a técnica de *Helm-Test*.

A análise estatística de resultados mostrou alta positividade (100%), sensibilidade (100%) e eficiência (100%) diagnóstica à técnica de *TF-Test Quantified*, especialmente quando avaliada com a técnica de *Helm-Test*, e tendo como parâmetro o *Gold Standard* (**Tabelas 5 e 6**).

Ainda, segundo a Tabela 7, a nova técnica parasitológica mostrou alto índice *Kappa* (100%), com intervalo de confiança de 95%, sendo considerada por este índice como *Quase Perfeita*, apesar do baixo número de casos comparados (onze comparações). Ao contrário, a técnica de *Helm-Test* apresentou baixo índice *Kappa* (42,10%), com o mesmo intervalo de confiança (95%), sendo considerada por este índice como *Moderada*. Vale mencionar que mesmo trabalhando animais com boa intensidade de infecção (70 cercarias por animal, por exemplo), esta técnica foi capaz de resultar em dois diagnósticos falsos negativos, o que a fez oscilar negativamente no intervalo de confiança (- 0,171 para 1,000).

Os resultados obtidos neste estudo permitirão ainda o prosseguimento futuro desta pesquisa em mais duas etapas, a saber: a) avaliação em humanos desta nova técnica de maneira interlaboratorial em área endêmica para esquistossomíase mansônica (Município de Salinas/MG); e, b) padronização da nova técnica no Ministério da Saúde do Brasil (Programa de Vigilância e Controle da

Esquistossomose). Estas duas etapas de pesquisa se constituirão em abordagem para o curso de doutorado do atual candidato de mestrado.

Este novo estudo certamente permitirá medir a correta eficiência diagnóstica da técnica de *TF-Test Quantified*, ao avaliar uma população humana com diferente intensidade de infecção (carga parasitária).

6. CONCLUSÕES

Em conformidade com os objetivos específicos deste projeto, uma nova técnica foi desenvolvida, avaliada e validada de maneira intralaboratorial para a detecção quantificada de ovos de *S. mansoni* em fezes de animais de experimentação. Estes estudos preliminares foram de extrema importância para a segunda etapa de trabalho a ser iniciada em breve, por meio de um estudo interlaboratorial que deverá ser realizado com uma população humana residente em zona endêmica (Salinas, M.G., Brasil) para esquistossomíase mansônica. Ademais, os achados do atual estudo permitiram concluir que:

A técnica de *TF-Test Quantified* apresentou alta eficácia diagnóstica, considerando que, apesar do número pequeno de avaliação comparativa estatística, conseguiu se equiparar ao *Gold Standard*, e se sobressair em relação à técnica de *Helm-Test*;

A nova técnica mostrou-se simples, rápida e prática em laboratório, de maneira higiênica, amparando-se totalmente nas normativas de Controle de Qualidade e Biossegurança impostas pelo Ministério da Saúde do Brasil; e,

O ganho de sensibilidade diagnóstica de forma quantificada que esta nova técnica deverá proporcionar será de estimável contribuição para inquéritos populacionais e controle desta parasitose em áreas endêmicas para esquistossomíase mansônica, de modo repercutir em contribuição social em Saúde Pública.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, Z, A. Schistosomiasis and Liver Fibrosis. **Parasite Immunol.**, v. 31, n.11, p. 656-63, nov. 2009.

ARAUJO, A.J.U.S.; KANAMURA, H.Y.; DIAS, L.C.S.; GOMES, J.F.; ARAUJO, S.M. Coprotest Quantitativo: Quantificação de Ovos de Helminhos em Amostras Fecais

Utilizando Sistema de Diagnóstico Comercial. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, n. 2, p. 115-124, abr./jun.,2003.

BARBOSA, F.S. Morbidade na Esquistossomose. **Rev. Bras. Malar. D. Trop.**, v. 3, pp. 159, 1967.

BELL, D.R. A new Method for Counting *Schistosoma mansoni* Eggs in Faeces. **Bull World Health Organ.**, v. 29, n.4, p. 525-30, 1963.

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

CALDEIRA, K.; TEIXEIRA, C.F.; SILVEIRA, M.B.; FRIES, L.C.; ROMANZINI, J.; BITTENCOURT, H.R.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. Comparison of the Kato-Katz and Helmintex Methods for the Diagnosis of Schistosomiasis in a Low-intensity Transmission Focus in Bandeirantes, Paraná, Southern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, vol.107, n.5, pp. 690-692, ago. 2012.

CARVALHO, G.L.X.; MOREIRA, L.E.; PENA, J.L.; MARINHO, C.C.; BAHIA, M.T.; MACHADO-COELHO, G.L. A Comparative Study of the *TF-Test*[®], Kato-Katz, Hoffman-Pons-Janer, Willis and Baermann-Moraes Coprologic Methods for the Detection of Human Parasitosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, vol.107, n.1, pp. 80-84, fev. 2012.

CARVALHO, J.B.; SANTOS, B.M.; GOMES, J.F.; SUZUKI, C.T.N.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; FALCAO, A.X.; PIERUCCI, J.C.; MATOS, L.V.S.; BRESCIANI, K.D.S. *TF-Test Modified*: New Diagnostic Tool for Human Enteroparasitosis. **J. Clin. Lab. Anal.**, v.1, p. 1-8, mai. 2015.

CHAIA, G.; CHAIA, A.B.Q.A.; MCAULLIFE, J; KATZ, N; GASPER, D. Coprological Diagnosis of Schistosomiasis: II – Comparative Study of Quantitative Methods. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 10, n.6, p. 349-53, nov./dez. 1968.

CHAVEZ, C.; COUFAL, C.D.; CAREY, J.B.; LACEY, R.E.; BEIER, R.C.; ZAHN, J.A. The Impact of Supplemental Dietary Methionine Sources on Volatile Compound Concentrations in Broiler Excreta. **Poult. Sci**, v.83, n. 6, pp. 901-910, jun. 2004.

CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The Global Status of Schistosomiasis and its Control. **Acta Trop.**, v. 77, n. 1, p. 41–51, out. 2000.

COELHO, W.M.D; GOMES, J.F.; FALCAO, A.X.; SANTOS, B.M.; SOARES, F.A.; SUZUKI, C.T.N.; AMARANTE, A.F.T.; BRESCIANI, K.D.S. Comparative Study of Five Techniques for the Diagnosis of Canine Gastrointestinal Parasites. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 24, n. 2, p. 223-226, mai./jun. 2015.

COELHO, W.M.D; GOMES, J.F.; LUMINA, G.; AMARANTE, A.F.T.; BRESCIANI, K.D.S.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; LEME, D.P.; FALCÃO, A.X. A New Method for the Diagnosis of Gastrointestinal Parasites in Dogs. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 22, p. 1-5, jan./mar. 2013.

COLLEY, D.G.; BUSTINDUY, A.L.; SECOR, W.E.; KING, C.H. Human Schistosomiasis. **Lancet**, v.383, n. 9936, p. 2253-2264, jun. 2014.

DOMINGUES, A.L; MEDEIROS, T.B; LOPES, E.P. Ultrasound versus Biological Markers in the Evaluation of Periportal Fibrosis in Human *Schistosoma mansoni*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 7, p. 802-807, nov. 2011.

ENK, M.J; LIMA, A.C.L.; DRUMMOND, S.C.; SCHALL, V.T.; COELHO, P.M. Z. The Effect of the Number of Stool Samples on the Observed Prevalence and the Infection Intensity with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. **Acta Trop.**, v. 108, n.2-3, p. 222-228, nov./dez. 2008.

FAPESP. Desenvolvimento e Validação de um Novo *Kit (TF-Test)*, Destinado ao Exame Parasitológico de Fezes. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (proc. nº 99/06228-4, Pesquisador Responsável/Coordenador Sumie Hoshino Shimizu), 2004.

FAPESP. Automatização do Diagnóstico de Parasitos Entéricos do Homem por Análise Computadorizada de Imagens. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (proc. nº 11/51467-0, Pesquisador Responsável/Coordenador Jancarlo Ferreira Gomes), 2011.

FAPESP. Estudo e Viabilização de Novos Paradigmas de Concentração e Identificação Parasitária. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (proc. nº 14/50393-1, Pesquisador Responsável/Coordenador Jancarlo Ferreira Gomes), 2014.

FEINSTEIN, A.R. *Clinical Epidemiology: The Architecture of Clinical Research*. Philadelphia (USA): Saunders Co., 1985. p. 185-186.

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

GALEN, R.S; GAMBINO, S.R. *Beyond Normality: The Predictive Value and Efficiency of Medical Diagnosis*. Nova York(USA): John Wiley and Sons, 1975.

GOMES, J.F. *Processamento de Amostras Fecais e Desenvolvimento da Técnica de Análises de Imagens por Computador, para Diagnóstico das Enteroparasitoses*. 2008. Tese Doutorado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

GOMES, J.F.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; DIAS, L.C.S.; ARAÚJO, A.J.S.A.; 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.**, v. 18, n. 2, p. 132-138, mar. 2004.

GOMES, J.F.; SUZUKI, C.T.N.; FALCAO, A.X.; COELHO, W.M.D.; CARDIA, D.F.F.; INÁCIO, S.V.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; SILVEIRA NETO, L.; BRESCIANI, K. D.S. Advances in the Canine Coproparasitological Examination. *Dogs - Domestication History, Behavior and Common Health Problems*. 45ed.Nova York: Nova Science Publishers, Inc., v. 23, p. 91-103, 2013.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infect Dis Clin North Am**, v.26, n. 2, p. 383-97, jun. 2012.

HALL, A. A Quantitative Variability of Nematode Egg Counts in Faeces: A Study Among Rural Kenyans. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 75, n.5, p. 682-7, 1981.

HALL, A. Intestinal Helminthes of Man: The Interpretation of Egg Counts. **Parasitology**, v. 85, p. 605-13, dec.1982.

HOFFMAN, W.A.; PONS, J.A.; JANER, J.L. The Sedimentation-Concentration Method in Schistosomiasis Mansoni. **J. Public Health**, v.9, p. 281-298, 1934.

HAILU, T; ABERA, B. Performance Evaluation of Direct Saline Stool Microscopy, Formol-Ether Concentration and Kato-Katz Diagnostic Methods for Intestinal Parasitosis in the Absence of Gold Standard Methods. **Trop Doct**, v.45, n.3, p.178-82, abr. 2015.

INÁCIO, S.V.; GOMES, J.F.; BRITO, R.L.L.; OLIVEIRA, B.C.M.; NAKAMURA, A. A.; SILVEIRA NETO, L.; FALCAO, A.X.; RIBEIRO, R.S.P.; MEIRELES, M.V.; BRESCIANI, K.D.S. Detecção da Infecção por *Cryptosporidium* spp. pela Coloração Negativa de Verde Malaquita e *TF-Test Conventional* com Confirmação pela Reação em Cadeia da Polimerase In: 6º SIMPÓSIO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL - XIV SEMANA DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA/Araçatuba, 2015.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS - BIOMANGUINHOS, FIOCRUZ. *Helm-Test*, Um Teste Qualitativo-Quantitativo Baseado na Tecnologia do Método de Kato-Katz, 2010.

KATO, K.A. A Correct Application of the Thick-Smear Technique with Cellophane Paper Cover. **A. Pamphlet**, p. 1-9, 1960.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A Simple Device for Quantitative Stool Thick Smear Technique in Schistosomiasis mansoni. **Rev Inst Med Trop São Paulo** v.14, n.6, pp. 397-400, 1972.

KONGS, A.; MARKS, G.; VERLÉ, P.; VAN DER STUYFT, P. Limitations of Kato-Katz Technique for Evaluating *S. mansoni* Infections. **Trop. Med. Int. Health**. v. 6, p.163-169,mar. 2001.

LUMINA, G.; BRICARELLO, P.A.; GOMES, J.F.; AMARANTE, A.F.T. Avaliação do kit "*TF-Test*" para o Diagnóstico das Infecções por Parasitos Gastrintestinais em Ovinos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 43, p. 496-501,jun. 2006.

LUTZ, A. O. *Schistosoma mansoni* e a Schistosomose, Segundo Observações Feitas no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.11, p.121-155, 1919.

MACLURE, M; WILLET, W.C. Misinterpretation and Misure of the *Kappa* Statistic. **Ame. J. Epidemiol.**, v.126, n.2, p. 161-169, ago. 1987.

MARTIN, L.K.; BEAVER, P.C. Evaluation of Kato Thick-Smear Technique for Quantitative Diagnosis of helminthes Infections. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 17, n.3, p. 382-391, mai.1968.

MORRONE, F.B; CARNEIRO, J.A; REIS, C. Study of Enteroparasites Infection Frequency and Chemotherapeutic Agents used in Pediatric Patients in a Community Living in Porto Alegre, RS, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 46, n. 2, p. 77-80, mar./abr. 2004.

NIKOLAY. B.; BROOKER, S.J.; PULLAN, R.L. Sensitivity of Diagnostic Tests for Human Soil-transmitted Helminth Infections: a Meta-analysis in the Absence of a True Gold Standard. **Int J Parasitol**, v. 44, n. 11, p. 765-74, out. 2014.

PEZZANI, B.C; MINVIELLE, M.C; CIARMELA, M.L; APEZTEGUÍA, M.C; BASUALDO,J.A. Community Participation in the Control of Intestinal Parasitosis at a Rural Site in Argentina. **Rev Panam Salud Publica**. v. 26, n. 6, p.471-7,dez. 2009.

REY, L. *Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais*. 4ª ed. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan. 2008.

ROTHMAN, K.J.; BOICE, J.D. *Epidemiologic Analysis with a Programmable Calculator*. Boston, M.A.(USA), Epidemiol. Resou. Inc., 1982.

SANTOS, B.M.; SOARES, F.A.; SUZUKI, C.T.N.; FALCAO, A.X.; GOMES, J.F. Avaliação da Técnica *TF-Test Modified* no Diagnóstico da Esquistossomíase Mansônica (Apresentação Oral). IN: VII CONGRESSO DA SOCIEDADE PAULISTA DE PARASITOLOGIA, São Carlos, SP, 2014.

SIQUEIRA, L.M.V. *Avaliação de Métodos Diagnósticos para Esquistossomose Mansonii em uma Área de Baixa Endemicidade no Município de Monte Claros, Minas Gerais, Brasil*.2011. Dissertação de Mestrado, Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte, Minas Gerais.

SOARES, F.A.; SANTOS, B.M.; SUZUKI, C.T.N.; SABADINI, E.; FALCAO, A.X.; GOMES, J.F. Utilização da Técnica de Flotação por Ar Dissolvido no Processamento de Amostras Fecais para o Diagnóstico de Parasitos Intestinais. In: 42º

CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS (Apresentação Oral), Rio de Janeiro, 2015.

SPEICH, B.; UTIZINGER, J.; MARTI, H.; AME, S.M.; ALI, S.M.; ALBONICO, M.; KEISER, J. Comparison of the Kato-Katz Method and Ether-concentration Technique for the Diagnosis of Soil-transmitted Helminth Infections in the Framework of a Randomized Controlled Trial. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 33, n.5, p 815-22, mai. 2014.

STOLL, N.R.; HAUSHEER, W.C. Concerning two Options in Dilution Egg Counting: Small Drop and Displacement. **Am. J. Hyg.**, v. 6, Suppl, p. 134-45, 1926

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO, a). Schistosomiasis: Countries x Indicators. Geneva, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO, b). Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases. First WHO Report on Neglected Tropical Diseases. Geneva, 2010.

ZHANG, Y.Y.; LUO, J.P.; LIU, Y.M.; WANG, Q.Z.; CHEN, J.H.; XU, J.M.; WU, J.; TU, X.M.; WU, G.L.; ZHANG, Z.S.; WU, H.W. Evaluation of Kato-Katz Examination Method in Three Areas with Low-level Endemicity of *Schistosomiasis japonica* in China: A Bayesian Modeling Approach. **Acta Trop.**, vol. 112, p. 16-22, out. 2009.

8. ANEXOS

ANEXO A: IMAGENS DE OVOS DE *Schistosoma mansoni* OBTIDAS PELAS TÉCNICAS DE KATO-KATZ E *TF-TEST CONVENTIONAL*.

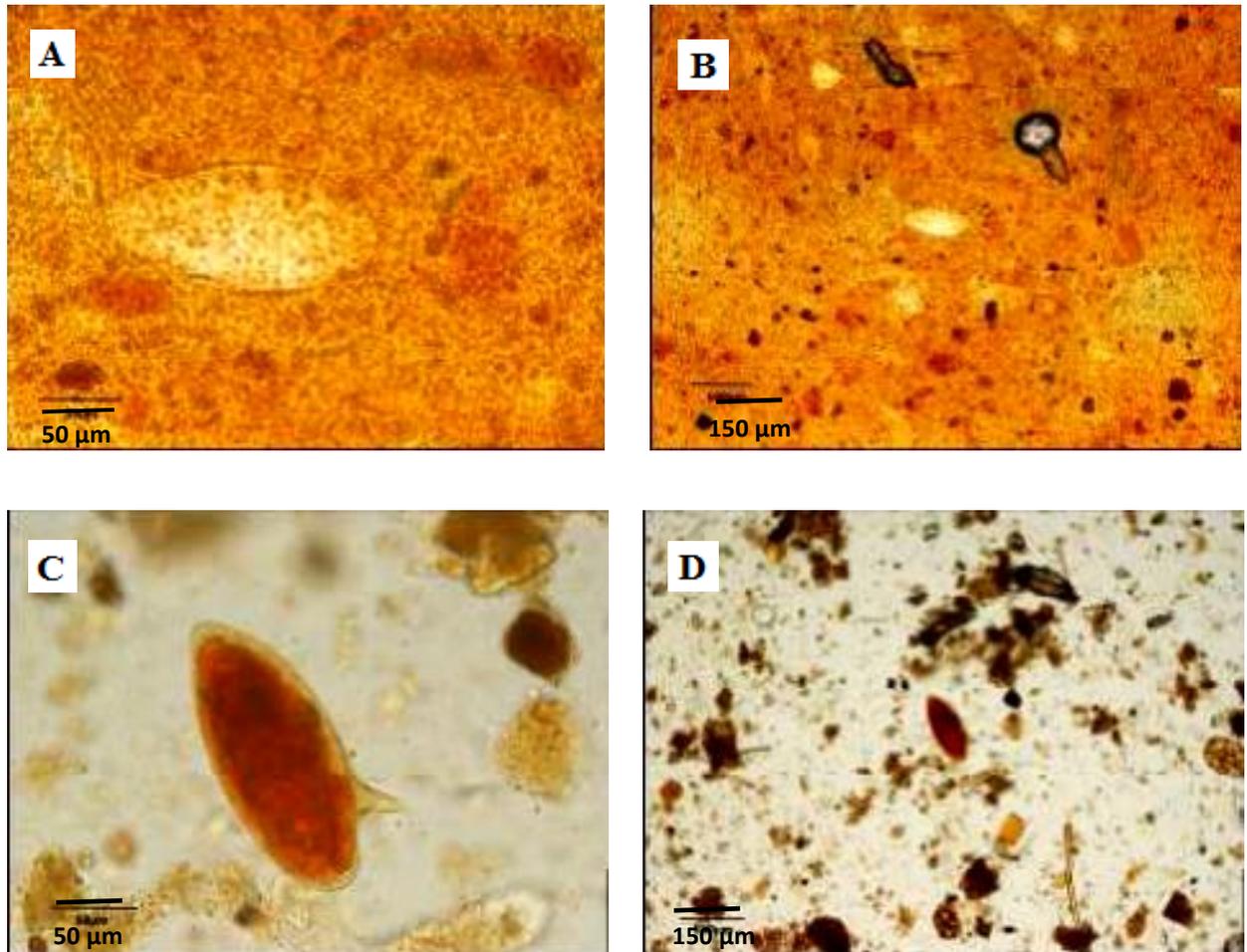
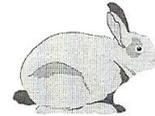


Figura 8: Ovos de *S. mansoni* obtidos pelo emprego de duas (2) técnicas parasitológicas. Em **(A)** ovo adquirido pela técnica de Kato-Katz, com aumento de 40 vezes em microscopia; em **(B)** ovo adquirido pela mesma técnica parasitológica, porém, com aumento microscópico de 10 vezes; em **(C)** ovo obtido por *TF-Test Conventional* com aumento de 40 vezes; e, em **(D)** ovo adquirido pela mesma técnica parasitológica, porém, com aumento microscópico de 10 vezes.

ANEXO B: COMPROVANTE DE AUTORIZAÇÃO PARA EXPERIMENTAÇÃO EM ANIMAIS EMITIDO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNICAMP



CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Validação da técnica de TF-TEST QUANTIFIED para diagnóstico da Esquistossomíase Mansônica", protocolo nº 3107-1, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Jancarlo Ferreira Gomes / Bianca Martins do Santos, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - CONCEA**, e foi aprovado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 1º. de julho de 2013.

Vigência do projeto: 04/2013-04/2015

Espécie/Linhagem: Camundongo heterogênico / Unib:SW(Swiss)

No. de animais: 44

Peso/Idade: 21 dias / 2g

Sexo: fêmeas

Origem: CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 06 de julho de 2015.



 Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
 Presidente



 Fátima Alonso
 Secretária Executiva

ANEXO C: DECLARAÇÃO SOBRE DIREITOS AUTORAIS

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE TF-TEST QUANTIFIED PARA O DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMÍASE MANSÔNICA**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 16 de Julho de 2015

Assinatura : Bianca Martins dos Santos
Nome do(a) autor(a): **Bianca Martins dos Santos**
RG n.º 27.046.602-2

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Jancarlo Ferreira Gomes**
RG n.º 11.632.528-8