



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**FELIPE AUGUSTO SOARES**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO LABORATORIAL DE UMA NOVA TÉCNICA  
DE DETECÇÃO DE PARASITOS INTESTINAIS UTILIZANDO DO PRINCÍPIO DE  
FLOTAÇÃO POR AR DISSOLVIDO**

Campinas - SP  
2021

FELIPE AUGUSTO SOARES

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO LABORATORIAL DE UMA NOVA TÉCNICA  
DE DETECÇÃO DE PARASITOS INTESITINAIS UTILIZANDO DO PRINCÍPIO DE  
FLOTAÇÃO POR AR DISSOLVIDO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, na área da Saúde da Criança e do Adolescente.

Thesis/Dissertation presented to the School of Medical Sciences of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in the Science, area of Child and Adolescent Health.

ORIENTADOR: PROF. DR. JANCARLO FERREIRA GOMES

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELO ALUNO FELIPE AUGUSTO SOARES E ORIENTADO PELO PROF. DR. JANCARLO FERREIRA GOMES

Campinas - SP  
2021

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Soares, Felipe Augusto, 1986-  
So11d      Desenvolvimento e validação laboratorial de uma nova técnica de detecção de parasitos intestinais utilizando do princípio de flotação por ar dissolvido / Felipe Augusto Soares. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Jancarlo Ferreira Gomes.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.  
Em regime multiunidades com: Instituto de Computação.

1. Parasitologia. 2. Doenças parasitárias. 3. Técnicas e procedimentos diagnósticos. 4. Flotação. I. Gomes, Jancarlo Ferreira, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Development and laboratorial validation of a new technique for detection of intestinal parasites using the dissolved air flotation principle

**Palavras-chave em inglês:**

Parasitology

Parasitic diseases

Diagnostic techniques and procedures

Flotation

**Área de concentração:** Saúde da Criança e do Adolescente

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

Jancarlo Ferreira Gomes [Orientador]

Katia Denise Saraiva Bresciani

Edvaldo Sabadini

Marco Antonio Penalva Reali

Aline do Nascimento Benitez

**Data de defesa:** 27-09-2021

**Programa de Pós-Graduação:** Saúde da Criança e do Adolescente

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-4262-5194>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8318350926378883>

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO**  
**FELIPE AUGUSTO SOARES**

**ORIENTADOR: JANCARLO FERREIRA GOMES**

**MEMBROS:**

- 1. PROF. DR. JANCARLO FERREIRA GOMES**
- 2. PROF. DRA. KATIA DENISE SARAIVA BRESCIANI**
- 3. PROF. DR. EDVALDO SABADINI**
- 4. PROF. DR. MARCO ANTONIO PENALVA REALI**
- 5. DRA. ALINE DO NASCIMENTO BENITEZ**

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

**Data de Defesa: 27 / 09 / 2021**

*Este trabalho é dedicado à minha mãe que sempre me apoiou, minha companheira e filha que são minha base e amparo em todos os momentos, aos meus avós, familiares e amigos que acreditaram em todas as minhas conquistas.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela graça da vida, por me conceder força e esperança no progresso como pessoa e profissional de ciência, a fé em Deus não pode ser explicada em obras como esta.

À minha mãe, Eleonice Soares, por todo apoio e colaboração no enfrentamento às dificuldades, e todos os familiares que me deram motivação e força.

À minha filha, Gabriela, e minha companheira, Viviane, que me confortaram nos dias difíceis e me ajudaram dia após dia a sorrir e sonhar.

Ao meu orientador, Jancarlo Ferreira Gomes, por todos os incentivos, amizade, pelas palavras de conforto e ensinamentos transmitidos.

Aos professores colaboradores em suas áreas de atuação, Alexandre Xavier Falcão, ao Prof. Edvaldo Sabadini, Profa. Katia Bresciani, Prof. Marco Antonio Penalva Reali pelas contribuições e compreensão e aos colegas de laboratório, Celso Suzuki, Bianca Martins, Stefany Laryssa, Saulo Hudson, Sandra Valéria e Aline Benitez por compartilharem do aprendizado acadêmico e pessoal que servem como o alicerce de um bom trabalho em equipe.

Ao Departamento de Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) e aos Institutos de Computação (IC) e Instituto de Química (IQ) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pelos auxílios e acreditarem neste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo n 2016/50501-4, processo n 2014/12236-1) e ImmunoCamp Ciência e Tecnologia pelo suporte financeiro que foram fundamentais na execução desta pesquisa aplicada na área da saúde.

## RESUMO

As parasitoses intestinais são um agravo à Saúde Pública mundial, sobretudo na população infantojuvenil localizada em regiões tropicais e equatorial em condições de vulnerabilidade. Para o diagnóstico laboratorial dos patógenos destas afecções, por praticidade e baixo custo é preconizado o Exame Parasitológico de Fezes (EPF), que apresenta de baixa a moderada sensibilidade diagnóstica e carece de aperfeiçoamento e inovações. A Flotação por Ar Dissolvido (FAD) é um eficiente princípio técnico amplamente empregado em outras áreas de atuação para a separação de sólidos dispersos em meio líquido. O objetivo neste estudo foi desenvolver e validar em pesquisa intralaboratorial um novo procedimento técnico de detecção parasitária intestinal a partir da adequação de um protótipo de FAD. As amostras fecais foram colhidas de 500 pacientes das Unidades Básicas de Saúde (UBS) da cidade de Campinas – SP e triadas por exame direto. As amostras positivas foram transferidas e processadas com o uso do kit laboratorial *TF-Test*. O sedimento resultante neste processamento foi dividido em três tubos de ensaio para triplicata de testes de FAD. O protótipo inicial de FAD foi avaliado quanto aos parâmetros de: a) surfactantes/concentrações b) fração volumétrica saturada c) dispositivo de agulha e d) coluna de flotação, em relação ao percentual de parasitos recuperados em conteúdo flotado e não flotado. A flotação por interação superficial entre microbolhas e as espécies de parasitos estudadas foi comprovada com o registro de imagens por estereomicroscópio e câmera digital de alta resolução nos ensaios de FAD. O protocolo operacional final foi comparado com a técnica de *TF-Test* conforme a concordância de resultados (Padrão Ouro), por meio de avaliação estatística de sensibilidade, especificidade e concordância *Kappa*. O surfactante CTAB 10% foi mais efetivo na flotação e concentração média (78.1%) de parasitos no conteúdo flotado, apesar de uma baixa recuperação de cistos de *Giardia duodenalis* (48%) quando comparado ao percentual de cistos (71.1%) obtido no conteúdo não flotado com surfactante SDS 15%. A taxa de 10% de volume saturado demonstrou regularidade e maior (80%) recuperação parasitária com o uso de CTAB 10%. As alterações técnicas referentes a inclusão do dispositivo de agulha na inserção de microbolhas e diminuição de dimensional da coluna de flotação não apresentaram diferença estatística na recuperação parasitária. Os índices de sensibilidade, especificidade, acurácia e concordância *kappa* apresentados pelo protocolo técnico FAD foram de 91%, 100%, 93% e Substancial ( $k=0.64$ ), respectivamente, próximo aos resultados de 89%, 100%, 92% e Substancial ( $k=0.63$ ) obtidos pela técnica de *TF-Test*. Concluimos que o protocolo técnico de FAD pode

ser aplicado no processamento de amostras fecais no exame laboratorial de rotina, possibilitando a detecção de parasitos intestinais de humanos.

**Palavras-chaves:** parasitologia; doenças parasitárias; técnicas e procedimentos diagnósticos; flotação.

## ABSTRACT

Intestinal parasitoses are a problem to Public Health worldwide, especially in children and adolescents settled in the tropical and equatorial regions under vulnerable conditions. The Ova and Parasites Examination (O&P) is the recommended laboratory method for diagnosing the pathogens of these diseases. It is practical and low cost, but it has low to moderate diagnostic sensitivity and lacks improvement and innovation. The Dissolved Air Flotation (DAF) is an efficient technical principle widely used in other areas, such as separating dispersed solids in liquid media. The aim in this study was to develop and validate in intralaboratory study a new technical procedure for intestinal parasites detection based on the adequacy of a DAF prototype. The fecal samples were collected from 500 patients at the basic health unit in Campinas – SP, and screened by direct smear examination. The positive samples were processed with the TF-Test laboratory kit. The sediment resulting from this processing was divided into three test tubes for triplicate tests using the DAF. We evaluated the initial DAF prototype regarding the percentage of recovered parasites in floated and non-floated content under the following parameters: a) surfactants/concentrations, b) saturated volume fraction, c) needle device and, d) flotation column. In the DAF tests, we obtained images from the surface interaction between microbubbles and the parasite species with a stereomicroscope and a high-resolution digital camera. The DAF final operational protocol was compared with the TF-Test technique according to the results' agreement (Gold Standard) by a statistical evaluation of sensitivity, specificity, and Kappa index agreement. The CTAB, 10% surfactant, was more effective to concentrate parasites in the floated content (78.1%), despite a low recovery of *Giardia duodenalis* cysts (48%) when compared to the percentage of cysts (71.1%) obtained in the non-floated content with SDS 15% surfactant. The 10% saturated volume rate showed regularity and greater (80%) parasitic recovery using CTAB 10%. The technical changes regarding the inclusion of the needle device for microbubbles generation and dimensional reduction of the flotation column did not show any statistical difference in the parasite recovery. The sensitivity, specificity, accuracy, and kappa agreement indices obtained by the DAF technical protocol were 91%, 100%, 93%, and Substantial ( $k=0.64$ ), respectively, close to results of 89%, 100%, 92 %, and Substantial ( $k=0.63$ ) obtained by the TF-Test technique. We conclude that the DAF principle can be applied in processing fecal samples in laboratory practice, enabling the detection of intestinal parasites in humans.

**Keywords:** parasitology; parasitic diseases; diagnostic techniques and procedures; flotation.

## SUMÁRIO

|                                                                               |           |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                          | <b>13</b> |
| 1.1 Parasitoses intestinais e suas dificuldades diagnósticas                  | 13        |
| 1.2 As parasitoses intestinais na infância e adolescência                     | 17        |
| 1.3 A Flotação por Ar Dissolvido e suas perspectivas                          | 19        |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                           | <b>23</b> |
| 2.1 Objetivo Geral                                                            | 23        |
| 2.2 Objetivos específicos                                                     | 23        |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                  | <b>24</b> |
| 3.1 Amostragem                                                                | 24        |
| 3.2 Unidade prototípica de FAD                                                | 25        |
| 3.3 Interação microbolha-parasitos                                            | 26        |
| 3.4 Ensaio de flotação e avaliações de recuperação parasitária                | 27        |
| 3.4.1 Experimento 1 (Teste de Surfactantes/Concentração)                      | 30        |
| 3.4.2 Experimento 2 (Recuperação de parasitos)                                | 31        |
| 3.4.3 Experimento 3 (Taxa de volume saturado)                                 | 31        |
| 3.4.4 Experimento 4 (Teste com sistema agulha)                                | 32        |
| 3.4.5 Experimento 5 (Volume da coluna da flotação)                            | 32        |
| 3.5 Controle de Qualidade e Biossegurança                                     | 33        |
| 3.6 Análise estatística                                                       | 33        |
| <b>4. RESULTADOS</b>                                                          | <b>35</b> |
| 4.1 Protótipo de testes laboratoriais de FAD                                  | 35        |
| 4.2 Dimensões de microbolhas geradas pelo protótipo de FAD                    | 35        |
| 4.3 Interação microbolhas-parasitos (Comprovação)                             | 37        |
| 4.4 Teste de Surfactantes/Concentração                                        | 39        |
| 4.5 Recuperação de parasitos com SDS 15% e CTAB 10%                           | 43        |
| 4.6 Taxa de volume saturado                                                   | 45        |
| 4.7 Teste com sistema de agulha                                               | 45        |
| 4.8 Volume da coluna de flotação                                              | 46        |
| 4.9 Protocolo operacional de FAD para o uso no diagnóstico de enteroparasitos | 47        |
| 4.10 Validação laboratorial                                                   | 47        |

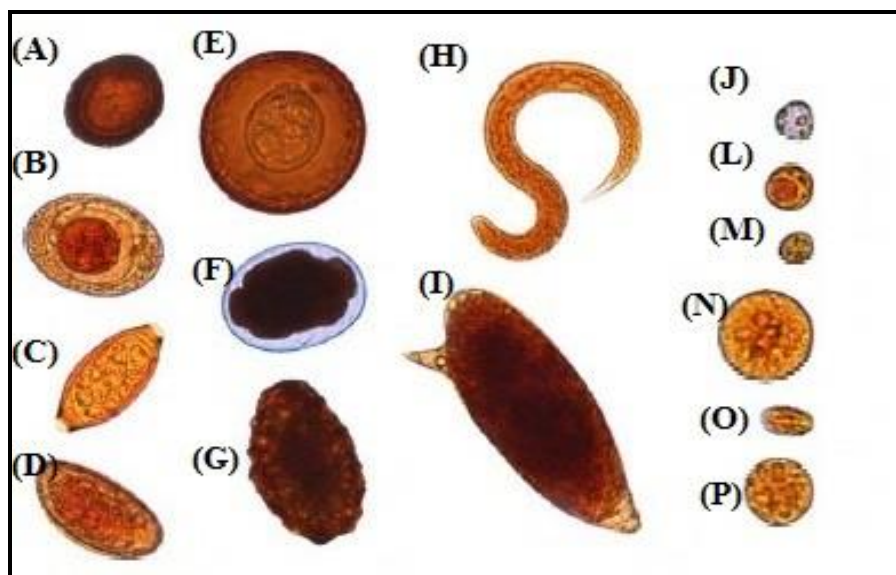
|                                            |           |
|--------------------------------------------|-----------|
| <b>5. DISCUSSÃO .....</b>                  | <b>51</b> |
| <b>6. CONCLUSÃO .....</b>                  | <b>59</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b> | <b>60</b> |
| <b>8. APÊNDICES .....</b>                  | <b>68</b> |
| <b>9. ANEXOS .....</b>                     | <b>72</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Parasitoses intestinais e dificuldades diagnósticas

As parasitoses intestinais (sinonímia, enteroparasitoses) são um agravo à Saúde Pública em todo o mundo, sobretudo na população infantojuvenil localizada em regiões tropicais e equatorial em condições de vulnerabilidade (1). Os agentes etiológicos relacionados às enteroparasitoses são aqueles que em alguma fase do seu ciclo evolutivo utilizam o trato digestório do hospedeiro vertebrado (2).

Os parasitos intestinais de seres humanos pertencem a dois grandes Reinos: o reino Protista (protozoários), e Animalia (helminths). Os protozoários são seres unicelulares com variadas características morfológicas estruturais e ciclo de vida, no qual algumas espécies de parasitos intestinais estão classificadas nos grupos taxonômicos dos Flagelados, Amebas, Ciliados e Esporozoários. Os helmintos são organismos multicelulares e estão distribuídos nos filos Platyelminths com indivíduos das classes Cestoidea e Trematoda e no filo Nematelminths com indivíduos da classe Nematoda. A **Figura 1** apresenta as principais espécies de protozoários e helmintos intestinais mais prevalentes no Brasil.



**Figura 1** – Estruturas parasitárias intestinais humanas: Helmintos (A) *Taenia* spp.; (B) *Hymenolepis nana*; (C) *Trichuris trichiura*; (D) *Enterobius vermicularis*; (E) *Hymenolepis diminuta*; (F) Ancilostomídeo; (G) *Ascaris lumbricoides*; (H) larva rabditoide de *Strongyloides stercoralis*; (I) *Schistosoma mansoni*; Protozoários (J) forma vacuolar de *Blastocystis hominis*; (L) *Iodamoeba bütschlii*; (M) *Endolimax nana*; (N); *Entamoeba coli*;

(O) *Giardia duodenalis*; (P) *Entamoeba histolytica* / *E. dispar* (Fonte: *Laboratory of Image Data Science* – LIDS - Instituto de Computação da UNICAMP).

Diversos fatores ambientais, biológicos e sociais estão envolvidos na dinâmica do parasitismo, nos quais afetam os índices epidemiológicos populacionais. Por exemplo, em países de clima tropical onde apresentam altas taxas de pluviosidade, umidade relativa e temperatura favorecem a manutenção e transmissão das formas parasitárias resistentes (3). A contaminação ambiental do solo, de cursos d'água e de alimentos, aliados a presença de indivíduos susceptíveis e a capacidade de evolução das larvas e ovos de helmintos e cistos, oocistos e esporos de protozoários são fatores intrinsecamente envolvidos na infecção (4). Os parasitos intestinais têm uma extensa distribuição geográfica (cosmopolita). No entanto, são os países tropicais em desenvolvimento que apresentam aspectos preponderantes para a disseminação destes agentes etiológicos (3). Porém, as regiões carentes de recursos socioeconômicos, negligenciadas em muitas vezes pelas políticas públicas de saúde, caracterizadas por vulnerabilidade e desigualdade social, propiciam endemias e a reemergência de espécies de parasitos intestinais oportunistas (4,5).

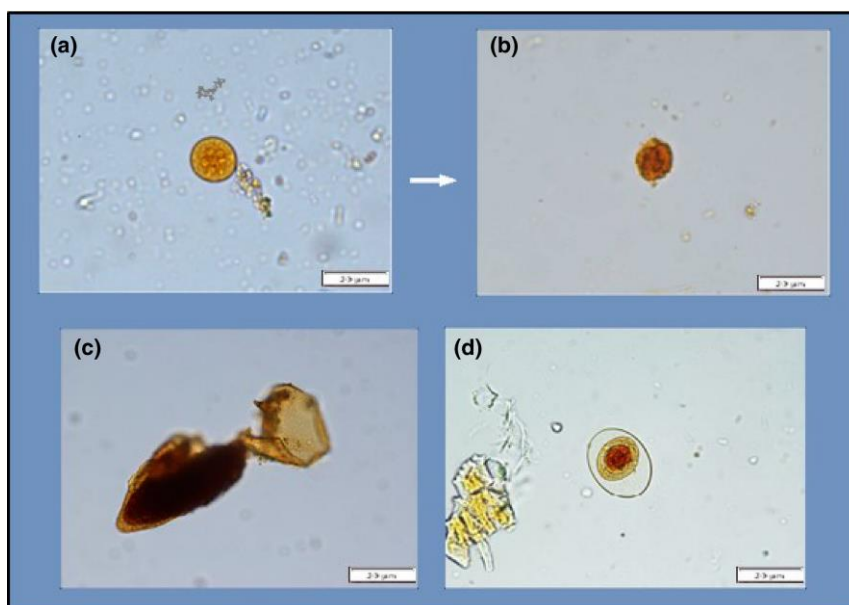
As infecções por agentes entéricos podem propiciar quadros anêmicos, dores abdominais, perda de peso, desnutrição, diarreia, dentre outras manifestações inespecíficas que podem também estar presentes em casos de infecções virais e bacterianas. O agravamento destas enfermidades depende da intensidade da infecção, em que fase a mesma se encontra (crônica ou aguda, por exemplo) no momento do tratamento e o estado imunológico da pessoa infectada, especialmente ao se tratar da populacional infantojuvenil (6,7). Sendo a sintomatologia clínica das parasitoses intestinais variável e inespecífica e em muitos casos assintomáticas, não é recomendável a utilização de somente o diagnóstico clínico destas disfunções, por não ser conclusiva esta modalidade de diagnose (8,9).

O exame laboratorial busca evidenciar a presença das formas evolutivas do agente etiológico por meio do Exame Parasitológico das Fezes (EPF) (2). Neste contexto, se torna indispensável para o diagnóstico definitivo como por meio da visualização por microscopia óptica dos cistos, trofozoítos, oocistos e esporos de protozoários, ou ovos e larvas de helmintos. O método de diagnóstico molecular detecta parte do material genético DNA (*DeoxyriboNucleic Acid*) ou RNA (*RiboNucleic Acid*) dos parasitos em amostra biológica e apresenta alta (90% - 100%) sensibilidade e precisão diagnóstica. Ao se tratar de uma rotina

laboratorial, a análise molecular para detectar parasitos intestinais é mais custosa e laboriosa quando comparado com a microscopia convencional, por exemplo (11,12). Os métodos de imunodiagnóstico detectam a presença de antígenos ou anticorpos. Contudo, esta modalidade diagnóstica pode resultar em exames falso-positivos ou falso-negativos, seja pela detecção de anticorpos de infecções tardias, por reações cruzadas ou ausência de resposta imunológica contra antígenos parasitários (13,14). Porém, estes métodos são ferramentas fundamentais para fins mais específicos, por exemplo, para a diferenciação de espécies ou para finalidade de pesquisa (8,15).

Com as análises laboratoriais disponíveis, o EPF é o procedimento técnico de menor custo operacional, com moderadas sensibilidade e especificidade (16), e com isso é recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS, em inglês, *World Health Organization* - WHO) para as realizações de inquéritos epidemiológicos em programas governamentais (17,18). Em caso de baixas intensidades de infecção, a acurácia deste exame pode ser aumentada pela adoção de procedimentos técnicos de recuperação parasitária com a eliminação de grande parte dos detritos fecais (19,20). Na intenção de se obter as estruturas parasitárias para o exame fecal, diversas técnicas foram desenvolvidas baseadas em princípios técnicos de separação de meios sólidos e líquidos (3).

Cinco princípios técnicos são adotados no processamento laboratorial do EPF, seja por uso de técnicas convencionais e/ou kits comerciais, tais como: a) sedimentação-espontânea (21,22); b) flutuação-espontânea (23,24); c) centrifugo-flutuação (25,26); d) centrífugo- sedimentação (9,27–29); e) termohidrotropismo positivo de larvas de nematoides (30–32). Porém, estes princípios de separação apresentam limitações de ordem física e biológica como excesso de artefatos em esfregaço fecal de lâmina de microscopia; restrita abrangência diagnóstica de espécies parasitárias; uso excessivo de reagentes químicos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente; e uso de soluções de alta densidade que proporcionam a alteração morfológica das diversas estruturas parasitárias eliminadas nas fezes, como observado na **Figura 2** (19,33–35). Estas particularidades podem reduzir a sensibilidade e acurácia das técnicas convencionais, e por consequência afetam a eficácia diagnóstica do EPF (36,37). Neste sentido, torna-se necessária a avaliação e o desenvolvimento de novos princípios técnicos mais abrangentes às diversas espécies parasitárias intestinais, que promovam a eliminação de impurezas fecais e alta concentração das espécimes morfológicamente intactas.



**Figura 2** – Fotomicroscopia óptica de (A - B) deformação morfológica de cisto de *E. coli*, (C) ovo de *S. mansoni* e (D) ovo de *H. nana* após 30 minutos de exposição à solução saturada de sulfato de zinco (1.18 g/ml). Fonte: Rosa et al. (2019) (35).

Diante da melhoria histórica no Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), das condições de saneamento básico, educação ambiental e programas de controle e tratamento medicamentoso da população em geral e o processo adaptativo das espécies parasitárias a estas novas condições ambientais pode ter ocasionado na redução da intensidade de infecção parasitária nas populações. Este processo adaptativo, provavelmente, pode ter proporcionado a perda de sensibilidade das técnicas convencionais, sobretudo, por terem sido desenvolvidas em anos remotos (8,39). Em virtude destas deficiências apresentadas no EPF, Rey (3) recomenda a aplicação simultânea de três técnicas de concentração parasitária ao exame. Entretanto, esta aplicação se torna impraticável em uma rotina laboratorial devido ao alto custo, tempo de execução, aumento na leitura de lâminas que repercutiria no cansaço do profissional de microscopia e consequentemente em possíveis erros de identificação parasitária (9,15).

A espécie *Giardia duodenalis*, por exemplo, pode apresentar inconstância na eliminação de suas estruturas nas fezes (40). Com isso, recomenda-se que faça a coleta de no mínimo três amostras fecais em dias alternativos para a análise, de modo que aumente a sensibilidade do exame e não resulte em falso-negativo (2,8,40). A técnica parasitológica convencional de *TF-Test*, ou *Three Fecal Test*, possibilita a tríplice colheita de amostras

fecais obtidas em dias alternados com o processamento laboratorial por meio do princípio de concentração de centrífugo-sedimentação, favorecendo o diagnóstico (8,9,36,37,41). Ao longo do tempo várias alterações procedimentais para o aprimoramento das técnicas convencionais e *kits* comerciais foram desenvolvidos para aumentar a sensibilidade desse diagnóstico, porém, este exame ainda deixa a desejar em eficiência (8,15,20).

Além dos avanços nas técnicas utilizadas no processamento de amostras fecais incorporadas no EPF, estudos recentes com enfoque em análises de imagens demonstram as sensibilidades de 85% a 98.2% na detecção de parasitos em fotomicrografias por meio do uso de algoritmos computacionais (42–44). Nos estudos de Osaku et al. e Suzuki et al., extensas bases de dados de imagens foram utilizadas para desenvolver técnicas de “*machine learning*” com o intuito de segmentar, classificar e identificar estruturas de parasitos em imagens (43,44). No sentido da automatização na diagnose de parasitos intestinais, esforços são implementados no desenvolvimento e validação do sistema Diagnóstico Automatizado de Parasitos Intestinais (DAPI) que é uma promissora inovação científica-tecnológica no campo da Parasitologia Clínica (45).

Em vista do exposto, para o desenvolvimento e validação de novos procedimentos técnicos com enriquecimento parasitário, eliminação de impurezas e manutenção da integridade parasitária é necessária a inovação científica para a melhoria da sensibilidade diagnóstica no EPF.

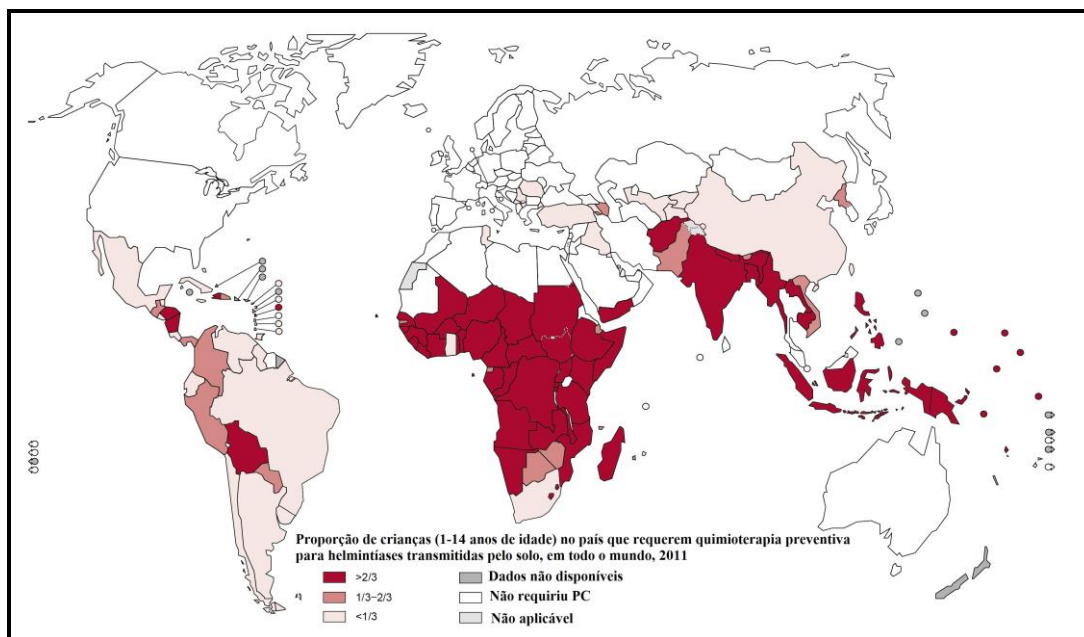
## **1.2 As parasitoses intestinais na infância e adolescência**

As infecções ocasionadas por parasitos intestinais constituem como um dos principais fatores de comorbidades e podem causar graves problemas à saúde humana (3). Os sintomas e sinais clínicos mais comuns de um indivíduo infectado incluem má absorção de nutrientes, dor abdominal, diarreia que pode variar de quadro agudo a crônico, anemia, desnutrição, distúrbio de crescimento, além de alterações na função cognitiva (7). Estas patologias ocorrem particularmente em crianças e adolescentes, devido à falta de higiene, desnutrição moderada e ao seu sistema imunológico imaturo (41,46). As parasitoses intestinais podem acometer a funcionalidade de órgãos e a intensidade parasitária da infecção pode agravar o quadro clínico e levar ao óbito indivíduos com o sistema imune em desenvolvimento (47,48).

Crianças e adolescentes que habitam regiões com ausência ou precário saneamento básico, falta de educação sanitária e ambiental, adensamento populacional e práticas inadequadas de higiene pessoal, fazem parte do público vulnerável às infecções oportunistas (4,41). Na infância as crianças ficam expostas ao primeiro contato com os agentes infecciosos, como também a resposta imune inata não se apresenta eficiente contra os parasitos intestinais (49). Por isso, deve-se dar uma maior atenção à população infantil de maneira a diagnosticar precocemente as infecções nesta fase da vida.

Anualmente, a *WHO* despende esforços em programas de controle de helmintos em crianças e adolescentes em idade escolar (50). Esta mesma Organização faz um acompanhamento anual fornecendo o tratamento quimioterápico por meio da administração oral de Albendazol e Mebendazol (princípio ativo, antihelmintico) às crianças e adolescentes de um a quatorze anos de idade em regiões hiperendemicas para estes agentes infecciosos (1,50). A diarreia é preocupante ao se tratar do público infantojuvenil, e continua a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade em crianças com menos de cinco anos de idade (51). Quase uma em cada cinco mortes de crianças é devido a diarreia, levando cerca de 760.000 destes jovens à morte por ano no mundo (1). Os protozoários habitantes do lúmen intestinal (*G. duodenalis*, *Entamoeba histolytica* e *Cryptosporidium* spp., por exemplo) são uns dos principais agentes etiológicos que proporcionam a diarreia aguda infantil (51). Associada a essa anormalidade gastrointestinal que afeta significativamente o estado nutricional, estudos mostram o prejuízo no desenvolvimento físico e cognitivo, e bem como o impacto no desempenho escolar (52,53).

No relatório do Programa de controle das geohelmintíases (*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *Ancilostomídeos*) e esquistossomíase (*Schistosoma mansoni*), a *WHO* (50) estimou existir cerca de dois bilhões de pessoas infectadas por estes agentes parasitários, sendo 610 milhões relacionados com crianças em idade escolar (4 a 14 anos de idade). As geohelmintíases estão amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (**Figura 3**). Em contraste, a esquistossomíase ocorre muito mais focalmente, dependendo das condições ambientais locais e na presença de água e de um hospedeiro intermediário (caramujo do gênero *Biomphalaria*) (54). Nessa perspectiva, são traçadas metas anuais no sentido de dar maior atenção à população infantil, mediante educação sanitária e ambiental (higienização pessoal), diagnóstico laboratorial efetivo de larga escala, e tratamento quimioterápico preventivo e específico para estas doenças negligenciadas elencadas pela *WHO* (54).



**Figure 3** – Distribuição global de geohelmintíases. Proporção de crianças que necessitam de quimioterapia preventiva em cada país. Fonte: adaptado de WHO (1).

Apesar do tratamento preventivo em massa na população ser uma medida de controle de epidemias, a medicação em pessoas não infectadas (ou não diagnosticadas) se torna um gasto desnecessário (55). Além disso é importante se atentar que o uso descontrolado e inespecífico dos anti-helmínticos pode originar variantes gênicas de parasitos resistentes aos fármacos usuais, como ocorre em espécies parasitárias de humanos e animais (56). Este cenário justifica a necessidade de um amplo diagnóstico frequente nestas populações que englobe a maior parte das espécies em um único exame (15).

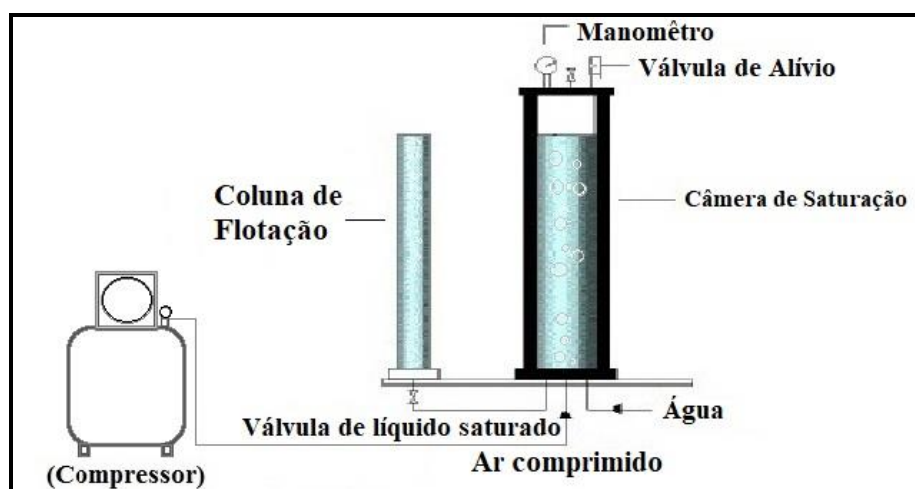
A ocorrência das parasitoses intestinais em crianças e adolescentes é constantemente relatada em estudos em diversas partes do mundo. No Brasil, estas parasitoses ainda são comuns, resultando em elevadas taxas de morbidade na população humana, sobretudo em idade escolar (8,36,41). Em um estudo de revisão bibliográfica, Melo et al. (2010) observaram que a ocorrência de parasitos intestinais variou entre 31 a 67% em escolares da região sudeste do Brasil (49). Entretanto, em regiões como a África, Ásia, América do Sul e Central, sob condições socioambientais propícias à disseminação de parasitos intestinais em população vulnerável, a prevalência destas doenças pode estar subestimada, onde pode exceder o índice de 80% (41,50,52). Diante desta realidade epidêmica das parasitoses intestinais, torna-se cada vez mais necessário o desenvolvimento e

uso de novas abordagens técnicas no diagnóstico destas enfermidades com maior eficiência e abrangência diagnóstica.

### 1.3 A Flotação por Ar Dissolvido e suas perspectivas

A Flotação por Ar Dissolvido (FAD) é um procedimento técnico desenvolvido e aplicado a partir de um princípio de separação sólidos suspensos em meio líquido (57). Este processo de separação ocorre com a saturação de gases em um meio líquido e a posterior despressurização de água saturada de ar ( $> 1\text{atm}$ ) com a formação de microbolhas de ar. Estas microbolhas, em contato e adesão com uma partícula formam um agregado (partícula-microbolha) de baixa densidade, submetido a uma força de empuxo que promove sua elevação para a camada sobrenadante para uma posterior separação mecânica (58).

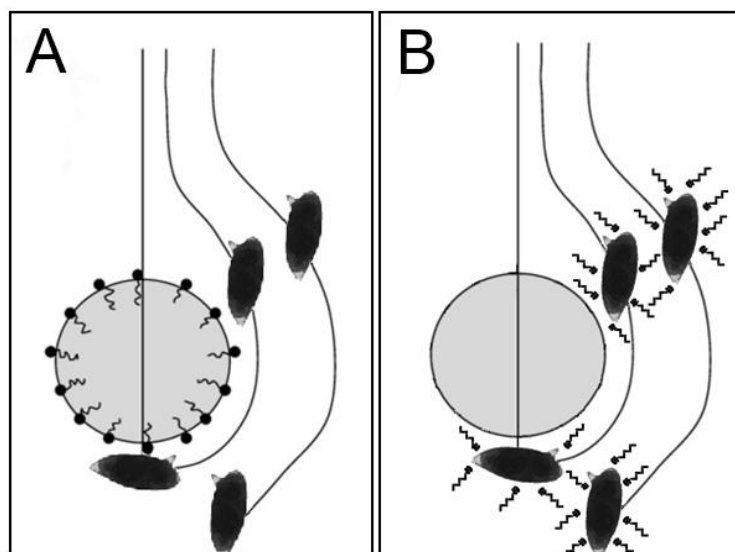
Este princípio técnico vem sendo utilizado com o intuito de purificação de espécies minerais, e a partir da década de 60 foi introduzido como alternativa no processo de clarificação no tratamento de águas residuais em Estações de Tratamento de Água (ETA) (59). O Sistema de FAD normalmente consiste de um compressor de ar que fornece ar pressurizado para uma câmara de saturação conectada a uma coluna de flotação (**Figura 4**). Atualmente este princípio técnico é objeto de estudos em diversas áreas de aplicação, por exemplo: tratamento de efluentes de indústria têxtil, tratamento de despejos líquidos industriais provenientes de laticínios, tratamento de fibras geradas no processo produtivo industrial de papel, tratamento de derivados da área petroquímica, recuperação de íons precipitados, e recuperação de algas (60,61).



**Figura 4** – Esquema ilustrativo de Unidade de flotação de bancada. Fonte: adaptado de Reali et al. (2001) (62).

Os fatores físico-químicos como as condições hidrodinâmicas quanto à pressão fornecida no sistema, as dimensões das microbolhas e partículas, a ocorrência de turbulência interna na coluna de flotação e a configuração da zona de contato, volume de líquido saturado e o tempo de coleta podem influenciar significativamente na eficiência de flotação (63,64). Os parâmetros que normalmente avaliam a efetiva adesão entre partícula e microbolha são medidos pelo ângulo ( $\theta$ ) de contato formado entre os vértices da interface (sólido-gás), como também pelo potencial *zeta* ( $\zeta$ ) que se refere à carga superficial (eletrostática) das interfaces gás-líquido e sólido-líquido. De modo que, quanto maior o ângulo de contato formado entre o agregado mais hidrofóbica é a partícula, e quanto menor são as forças eletrocinéticas de repulsão entre o agregado, maiores são as forças de interação e adesão (58). O valor de potencial *zeta* de microbolhas em diferentes condições de pH (potencial hidrogeniônico), mostra valores negativos em pH normal (65,66). Em geral, a maioria dos compostos orgânicos, conteúdos celulares e microrganismos, por exemplo, em condições próximas da neutralidade (pH 6 a 8) apresentam potencial *zeta* entre -14 e -30 mV (67).

O procedimento de FAD pode ser feito com o uso de surfactantes que atuam como reagentes coletores químicos não danosos (**Figura 5**), utilizados para reforçar a interação da superfície entre partícula-microbolha. Reagentes orgânicos e inorgânicos são utilizados na flotação para a adsorção nas interfaces (65). Os reagentes utilizados além de reforçar a interação eletroquímica com a formação de agregados de alta carga iônica e neutralizando as forças repulsivas, também diminuem a tensão superficial das microbolhas no qual favorece uma adesão mais estável entre a microbolha e partícula (63,68).



**Figura 5** – Mecanismos de atuação de surfactante. (A) Modificador da superfície da bolha (cinza) para ação eletrostática. (B) Modificador da superfície da parasitos alvo para ação hidrofóbica. Fonte: adaptado de Henderson et al. (2009) (69).

Conforme análises de Plummer et al. (70) com o intuito de purificar a água em estações de tratamento foi observada a remoção de cistos de *G. duodenalis* e oocistos de *Cryptosporidium* spp. pela FAD, apresentando ser mais eficiente do que o procedimento laboratorial de sedimentação-espontânea usado no setor ambiental (71). Além destes relatos, o sistema de FAD é utilizado na recuperação de algas, lodo e outros organismos que possuem estruturas celulares similares às estruturas parasitárias (60,72,73). A FAD é um procedimento técnico que pode ser aproveitado em diversas linhas de atuação que têm como abordagem a recuperação de estruturas de interesse.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo Geral*

Nosso objetivo neste estudo foi viabilizar, desenvolver, avaliar e validar em laboratório um novo procedimento técnico de recuperação e detecção de parasitos intestinais, por meio da adequação de Flotação por Ar Dissolvido (FAD), adaptando-o para o exame parasitológico das fezes humanas.

### 2.2 *Objetivos Específicos*

- Obter amostras fecais para triagem das espécies parasitárias intestinais representativas por intermédio do Secretaria de Saúde e Laboratório municipal de Campinas;
- Determinar entre dois surfactantes suas concentrações ótimas na recuperação de parasitos;
- Confirmar por registro de imagens as dimensões das microbolhas e sua interação de contato com espécies parasitárias intestinais;
- Avaliar a média percentual de recuperação de estruturas parasitárias (média de larvas-ovos-cistos por lâmina) em diferentes condições dos parâmetros de: a) surfactantes/concentrações b) fração volumétrica saturada c) dispositivo de despressurização por agulha e d) colunas de flotação no dispositivo de FAD;
- Definir os valores ótimos dos parâmetros avaliados para padronização do princípio técnico de concentração de parasitos intestinais com o uso da FAD;
- Validar um protocolo técnico operacional de FAD, a partir da análise estatística não paramétrica de sensibilidade, especificidade, concordância e classificação *Kappa (k)*.

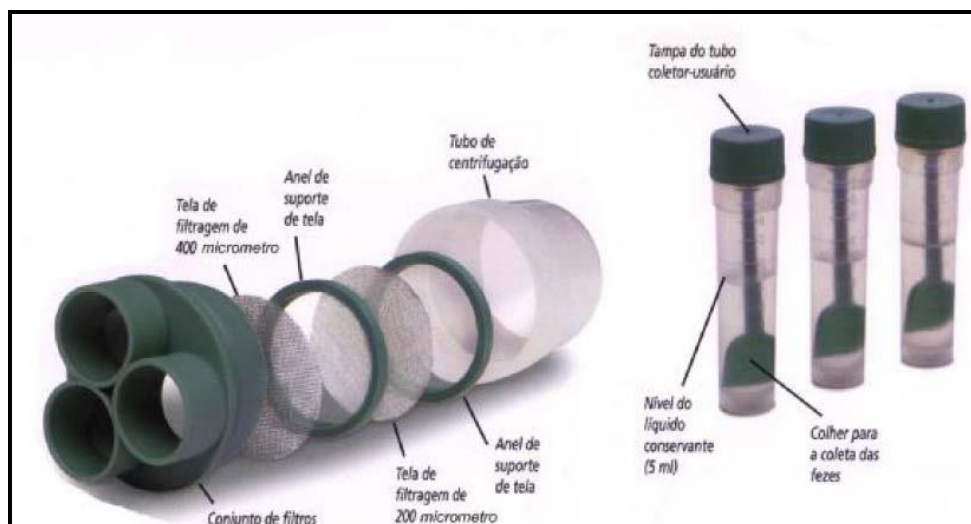
### 3. MATERIAL E METODOS

Este trabalho foi executado e recebeu os apoios irrestritos do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas (FCM), “*Laboratory of Image Data Science*” (*LIDS*) do Instituto de Computação (IC) e do Laboratório de Físico-Química do Instituto de Química (IQ) pertencentes à Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), tendo assim uma perspectiva multidisciplinar com apoio estrutural e técnico-científico que amparou todas as etapas da pesquisa.

#### 3.1. Amostragem

Para a aquisição do material biológico (amostra fecal) desta pesquisa, foi realizado conforme autorização prévia dos responsáveis pelas instituições proponentes UNICAMP e Secretaria Municipal de Saúde da cidade de Campinas - SP. Para a concessão deste material o protocolo de Bioética em Pesquisa foi seguido estritamente e aprovado pelo Comitê de Ética da Pró-Reitoria de Pesquisa da UNICAMP sob o parecer de número 2.467.727 (CAAE 79823117.7.0000.5404 92 <http://plataformabrasil.saude.gov.br>) (**Anexo**).

Um total de 500 amostras foram colhidas para atender a demanda de testes do estudo. As colheitas de campo ocorreram com uso de frasco coletor apropriado (capacidade 100mL) contendo 5mL de líquido preservador a base de solução de formalina tamponada a 7,2%. Em laboratório, as amostras foram previamente homogeneizadas e transferidas uniformemente para quatro (4) kits da técnica convencional de *TF-Test* (**Figura 6**), adicionado o volume de 500 µL com pipeta *Pasteur* aos tubos coletores do kit *TF-Test*. As quatro amostras foram processadas pela técnica convencional de *TF-Test* (9), e os materiais obtidos foram separados como: uma (1) amostra controle (sem processamento pela FAD); e, três (3) amostras para processamentos em ensaios pela FAD (triplicata).



**Figura 6** – Kit detalhado que faz constituir parte da técnica parasitológica de *TF-Test*. (Imagem: cortesia projeto FAPESP, Proc. N. 99/06228-4).

### 3.2. Unidade prototípica de FAD

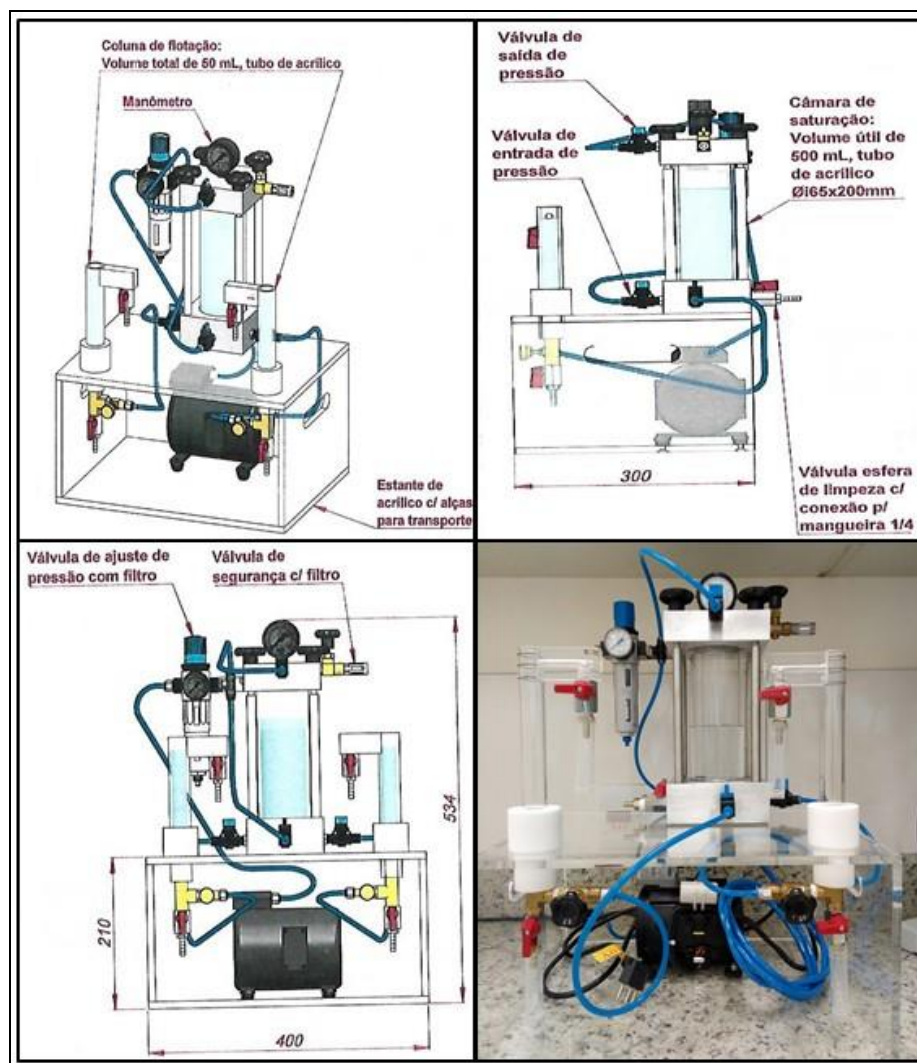
Em um estudo piloto viabilizamos e desenvolvemos este protótipo de unidade de teste FAD por meio de experimentos laboratoriais. Para que esta unidade de FAD atendesse as configurações de dimensional compacto para bancada laboratorial e fácil manuseio, elaboramos por meio de *designer* e fabricação industrial o protótipo inicial a seguir.

O sistema protótipo inicial de testes de FAD possui os seguintes componentes:

a) Equipamento câmara de saturação (*Ethik Technology* - modelo *Jartest* 218-3LDB): Consiste em um tubo de acrílico cilíndrico vedado nas suas extremidades por chapas de alumínio rosqueadas por quatro barras de ferro (fechamento hermético). Este equipamento tem capacidade para 500 mililitros de água e resistente à pressão interna de até 8 bar.

b) Coluna de flotação: Composta por um tubo de acrílico cilíndrico acoplado em uma base de polipropileno que contém uma conexão tipo agulha de inserção de líquido pressurizado e uma conexão tipo esfera para o esvaziamento da coluna (**Figura 7**), e

c) Equipamento compressor de ar marca *Biomec* (modelo BCP390/SCN): Fornece ar comprimido com vazão máxima de 39 L/min, potência motor de 90W e pressão máxima de 8 bar/114psi, com condução de ar comprimido via tubos de poliuretano 0,75 mm de espessura.



**Figura 7** – Unidade prototípica compacta do sistema de Flotação por Ar Dissolvido (Fonte: LIDS do IC - UNICAMP).

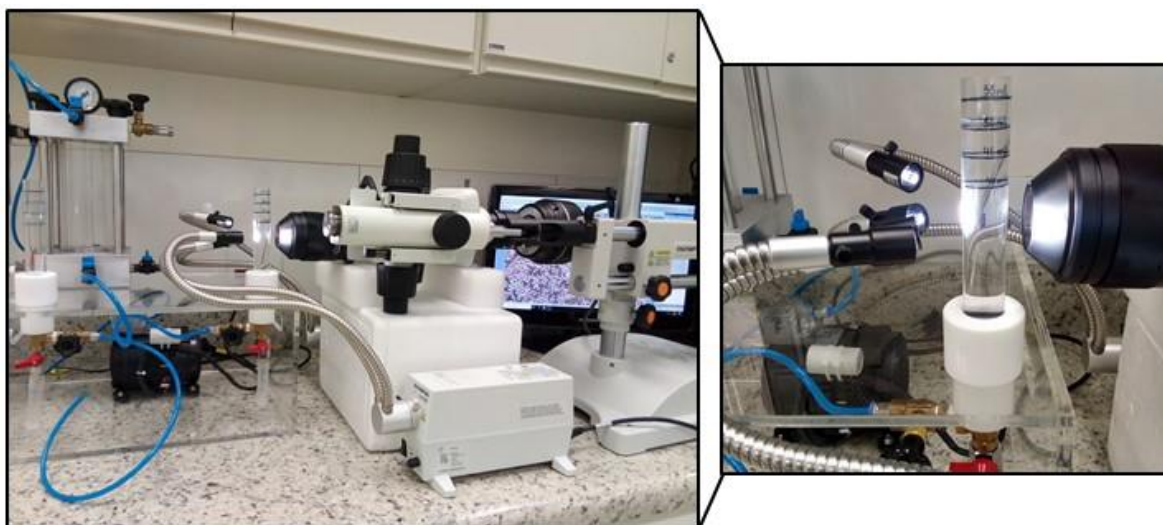
No decorrer dos experimentos e com o tempo de uso, este protótipo foi avaliado quanto sua durabilidade, observadas as características de segurança, baixa emissão de ruído e resistência ao uso contínuo, com a possibilidade de alteração nos componentes.

### 3.3. Interação microbolha-parasitos

A captura de imagens durante a flotação do material fecal foi realizada com o auxílio de estereomicroscópio para permitir o registro e caracterização do processo de adesão entre microbolha e parasito. O sistema de aquisição de imagens consistiu de um equipamento

estereomicroscópio da marca *Olympus SZX 16*, base *SZ2-STU2 Universal Stand* com rotação de 360° e câmera digital *Olympus DP 74* de alta resolução e ampliação de imagem (**Figura 8**).

As amostras triadas pelo método de esfregação direto em lâmina de microscopia e com resultado positivo foram transferidas aos tubos coletores *TF-Test* e previamente processadas pela técnica de *TF-Test* convencional. O sedimento obtido por este processamento foi submetido ao procedimento de FAD conforme descrito na etapa seguinte (tópico 3.4) de ensaios de flotação.



**Figura 8** – Estereomicroscópio preparado para captura de imagens e vídeo do interior da coluna de flotação. (Fonte: LIDS do IC - UNICAMP).

A captura de imagens das microbolhas geradas pelo sistema de FAD possibilitou a medição do diâmetro ( $\varnothing$ ) das microbolhas com mensuração pelo *software* computacional *CellSens*®. A distribuição destas medidas e mediana dos diâmetros foi comparada entre as variáveis de uso de surfactantes catiônico, aniônico e sem surfactante na câmara de saturação.

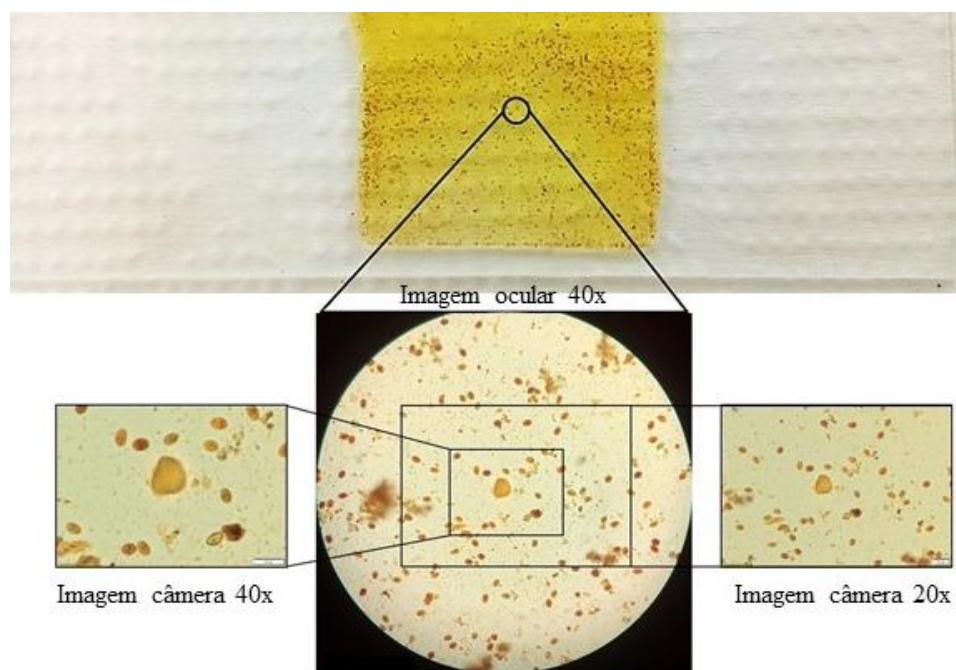
### **3.4. Ensaios de flotação e avaliações de recuperação parasitária**

Nos ensaios de FAD utilizamos os seguintes parâmetros iniciais para a preparação do sistema: pH 7 - 7,2; temperatura 20 ° - 26 ° C; pressão - 5 bar; tempo de saturação - 15 minutos; e, taxa de volume líquido saturado - 10%. A câmara de saturação foi preenchida até o volume de 500 mL de água tratada e submetida a saturação constante de ar por 15 minutos.

O material biológico triado pelo método de esfregação direto em lâmina de microscopia foi transferido em 500  $\mu$ L em cada um dos três tubos de colheita do *kit*

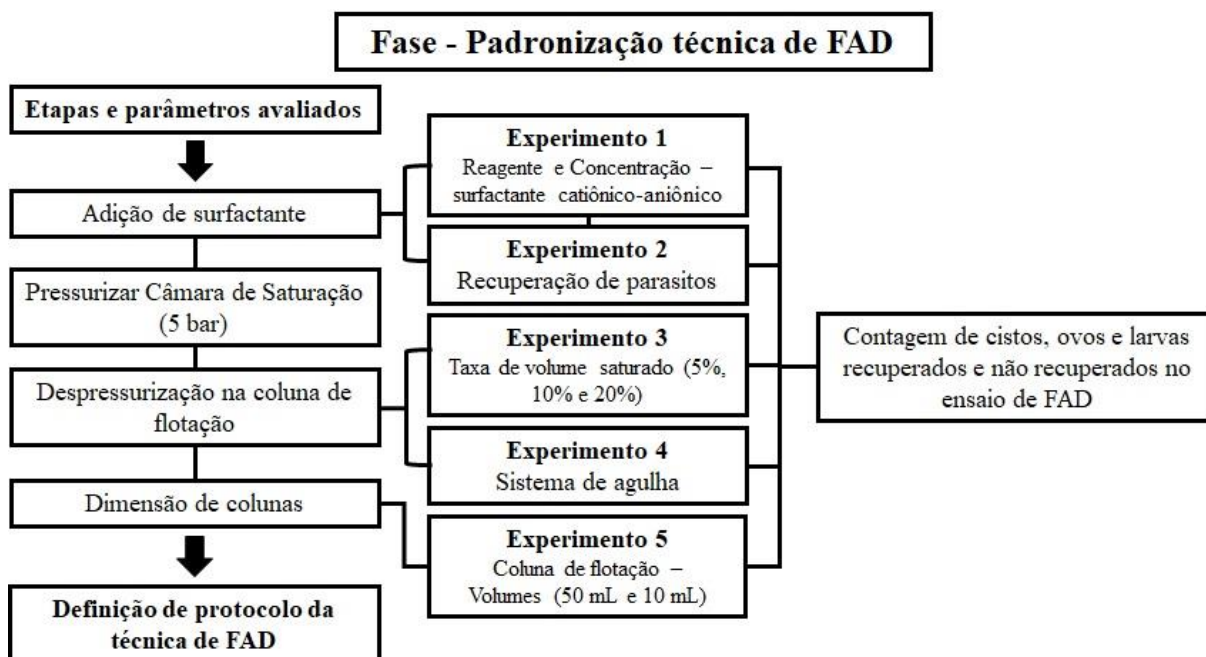
parasitológico *TF-Test*. A filtração da amostra foi realizada a partir do protocolo operacional da técnica de *TF-Test*, disponível no site do fabricante BioBrasil Biotecnologia (<https://bio-brasil.com/tf-test/>), contudo não aplicamos acetato de etila e detergente neutro nesta etapa. O sedimento obtido por este processamento foi diluído em água tratada em Osmose Reversa para obter uma suspensão fecal total de 10 mL em tubo de ensaio. Esta suspensão fecal foi homogeneizada em agitador tipo Vórtex por 30 segundos. A coluna de flotação foi preenchida por água tratada até um nível desejável para uma determinada taxa líquido saturado. Com o auxílio de pipeta plástica descartável tipo *Pasteur*, a amostra foi transferida a partir da metade inferior da coluna. Em seguida, a coluna foi acionada pela válvula de despressurização e o material suspenso foi capturado por meio de processos físico-químicos de adesão e elevação das microbolhas até uma camada sobrenadante. Por meio de pipetagem, o material flotado referente a 10 mL de suspensão contido na parte superior da coluna de flotação foi transferido para um tubo de ensaio e centrifugado a 500 *g* por dois minutos. A suspensão não flotada (volume de 40 mL) foi obtida por meio de uma válvula de esvaziamento localizada na parte inferior da coluna de flotação, e a seguir, centrifugada a 500 *g* por dois minutos. O volume de 50  $\mu$ L de sedimento do material centrifugado obtido pelos dois processos (flotado e não flotado) foi condicionado na preparação das lâminas de microscopia. Todas as etapas do processo supracitado estão demonstradas em imagem do **Apêndice 1**.

Na preparação do esfregaço fecal em lâmina e lamínula, foram adicionados 50  $\mu$ L de água tratada e 50  $\mu$ L de solução corante de Lugol para observação em microscópio óptico de luz convencional *Olympus* (modelo CX31), com captura de imagem por câmera digital *Olympus* (modelo SC100). Em cada leitura, ovos e larvas de helmintos observados foram quantificados com contador manual por meio da varredura completa da lamínula (24x24mm), em um total de vinte lâminas de microscopia (sedimento flotado = 10 lâminas, e sedimento não flotado = 10 lâminas). Para estimar a concentração de protozoários recuperados pelos testes, uma média de cistos por campo visual foi determinada por leitura de cinco campos centrais em cada lâmina (**Figura 9**), como adaptação do método que estima a concentração destes organismos na lâmina de microscopia (19,29).



**Figura 9** – Esquema de lâmina de microscopia para leitura e registro de número médio de protozoários (*Giardia* spp.) por campo visual.

Nos ensaios experimentais do sistema de FAD avaliamos os parâmetros de FAD em relação ao número de parasitos contados presentes no conteúdo flotado e não flotado, conforme o fluxograma de experimentos expresso na **Figura 10**.

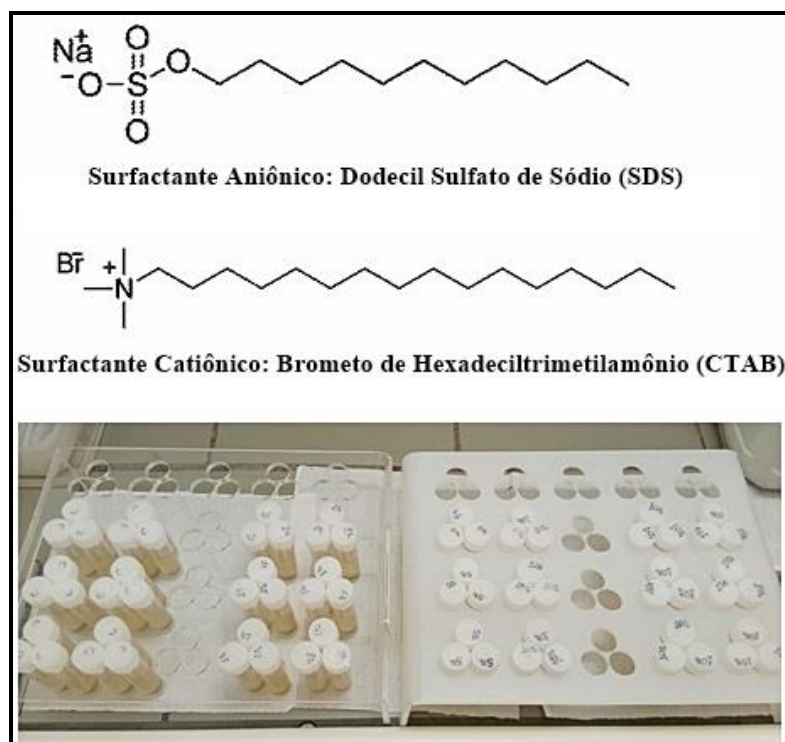


**Figura 10** – Fluxograma de experimentos com os parâmetros de FAD para padronização de protocolo técnico de recuperação parasitária para o exame parasitológico.

### 3.4.1. Experimento 1 (Teste de Surfactantes/Concentração)

Nas primeiras avaliações foram selecionados dois tipos de surfactantes (aniônico e catiônico) para alteração de carga superficial das microbolhas. Os surfactantes preparados para avaliação de recuperação de parasitos pela FAD foram o aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) ( $C_{12}H_{25}NaO_4S$ ) (Concentração Micelar Crítica: 8 – 8,2 mM) e o catiônico Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (CTAB) ( $CH_3(CH_2)_{15}N(CH_3)_3Br$ ) (Concentração Micelar Crítica: 0.9 – 1 mM) (**Figura 11**) (74). Três concentrações de SDS 1%, 10% e 15% e CTAB 1%, 5% e 10% foram preparadas para posterior diluição na água na câmara de saturação na proporção de 500 mL de água para 2,5 mL de surfactante, de maneira a atingir as concentrações finais de SDS: 0,005%; 0,05% e 0,075% e CTAB: 0,005%; 0,025% e 0,05%, respectivamente. Estes valores de concentração dos surfactantes foram definidos a partir de estudos prévios referentes à proporção de surfactante utilizado no protocolo operacional do *TF-Test*, no qual é utilizada a diluição 10.000 : 25  $\mu$ L de surfactante neutro sem afetar as estruturas parasitárias deste estudo (8,9). Nós optamos pela atuação dos surfactantes como modificadores diretamente nas microbolhas (Figura 5 A) no sentido de permitir uma interação eletrostática e seletiva entre as microbolhas e os parasitos alvos deste estudo. A abordagem de interação hidrofóbica com uso de surfactante em todo o material fecal (Figura 5 B) sem distinção entre parasitos e não parasitos (impurezas fecais) faria com que as microbolhas aderissem sem seletividade na amostra.

Como estudo piloto, as espécies *G. duodenalis*, *A. lumbricoides* e *Strongyloides stercoralis* que apresentam diferentes estruturas de eliminação nas fezes (cisto, ovo e larva, respectivamente) foram selecionadas para demonstrar o comportamento de recuperação/concentração de parasitos no conteúdo flotado e não flotado da FAD. Amostras triadas pelo método de esfregaço fecal direto, foram misturadas e separadas igualmente em tubos de colheita para 12 ensaios teste (triplicatas – Controle, Concentração 1, 2 e 3) dos surfactantes, **Figura 11**.



**Figura 11** – Estrutura química de reagentes e separação de amostras para triplicatas de testes.

### 3.4.2. Experimento 2 (Recuperação de parasitos)

Esta etapa de ensaios de FAD foi conduzida utilizando a concentração dos surfactantes eleitos com valores ótimos em recuperação de parasitos no Experimento 1. Tendo em vista esta condição, ensaios em triplicatas para cada espécie detectada na triagem permitiu avaliar mais sete espécies de parasitos intestinais: *Entamoeba coli*, *Hymenolepis nana*, *Enterobius vermicularis*, Ancilostomídeos, *Taenia spp.*, *S. mansoni* e *T. trichiura*. Os testes com os surfactantes em paralelo com o Controle (sem surfactante) demonstraram a recuperação dos parasitos (flotado e não flotado) seguindo o método e parâmetros fixados no protocolo de ensaios da FAD expresso no tópico 3.4.

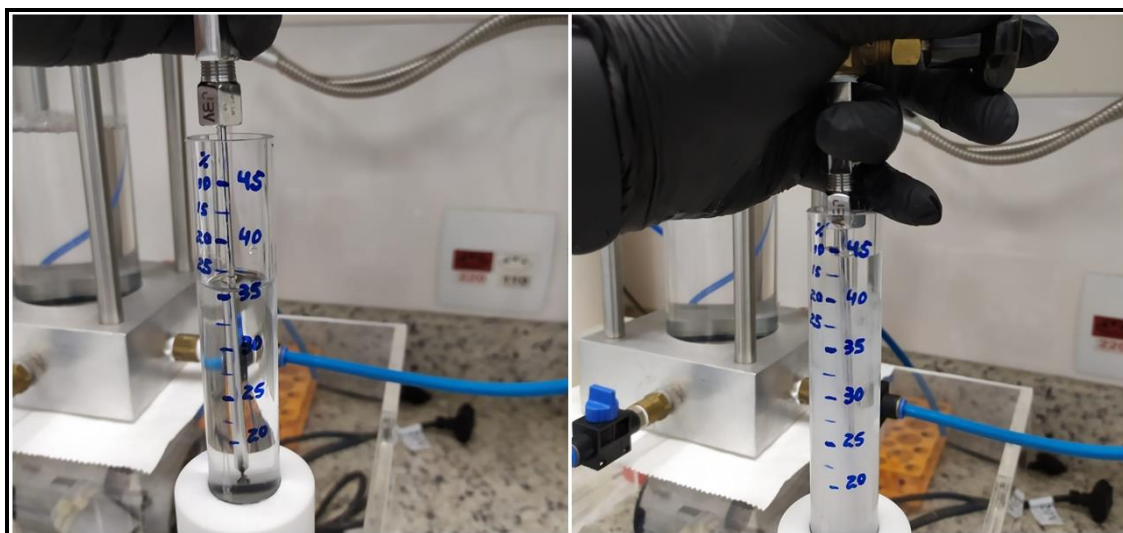
### 3.4.3. Experimento 3 (Taxa de volume saturado)

Nesta etapa de experimento avaliamos o percentual de recuperação de parasitos (flotado e não flotado) em relação ao volume de água saturada de ar (Taxa de volume saturado) no interior da coluna de flotação. O método e parâmetros de FAD fixados neste experimento utilizou o protocolo operacional de ensaios expresso no tópico 3.4. O volume de 10% de fração saturada (5 mL) nos primeiros registros de recuperação foi utilizado como

resultado Controle para verificar o desempenho de recuperação percentual dos parasitos nos volumes de 5% (2,5 mL) e 20% (10mL) de volume saturado inseridos na coluna de flotação. As amostras triadas foram separadas igualmente em tubos de colheita para os ensaios em triplicatas para cada parâmetro avaliado.

#### 3.4.4. *Experimento 4 (Teste com sistema de agulha)*

A inserção de microbolhas na base da coluna de flotação foi substituída por um novo dispositivo tipo agulha (**Figura 12**). Os parâmetros da FAD neste experimento foram os previamente fixados no tópico 3.4. A agulha foi inserida no interior da coluna (50 mL) com o orifício de injeção no fundo da coluna onde foram inseridas as microbolhas até completar a coluna. Este novo dispositivo foi avaliado por meio da comparação dos primeiros resultados obtidos pelo protótipo inicial (inserção na base da coluna) em relação ao percentual de parasitos recuperados (flotado) com o uso de surfactante CTAB 10%.

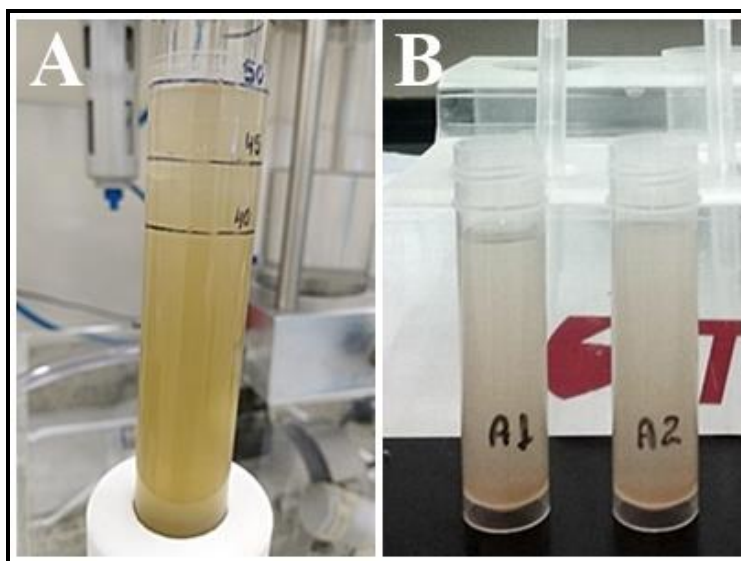


**Figura 12** – Dispositivo em formato de agulha em aço inoxidável com válvula tipo agulha para inserção de microbolhas no interior da coluna de flotação.

#### 3.4.5. *Experimento 5 (Volume da coluna de flotação)*

Neste experimento avaliamos uma nova coluna de flotação com volume de 10 mL (**Figura 13**) em comparação com os resultados de recuperação de parasitos (flotado) registrados com a coluna de 50 mL (Controle) obtidos no Experimento 4. Em ambos os testes foram aplicados o dispositivo tipo agulha. A coluna de flotação com o volume de 10 mL foi utilizada neste experimento de acordo os parâmetros da FAD fixados no tópico 3.4. As

amostras fecais foram separadas em tubos de colheita para os ensaios em triplicatas para cada espécie detectada na triagem.



**Figura 13** – Modelos de colunas de flotação (A) Coluna de 50 mL (B) Colunas de 10 mL.

### **3.5. Controle de Qualidade e Biossegurança**

Durante a condução deste estudo serão tomados os cuidados que são descritos nas instruções da técnica convencional de *TF-Test*, para a realização das etapas de colheita, homogeneização, preservação, transporte e processamento laboratorial de amostras fecais, de acordo com as normas de Controle de Qualidade (CQ) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Além disso, serão atentados e obedecidos todos os critérios de segurança para a realização de processamento laboratorial das mencionadas técnicas parasitológicas, como por exemplo, mediante usos de jaleco, luvas descartáveis, óculos de proteção, capela de exaustão de ar e descarte de materiais sólidos e líquidos tóxicos contaminantes em recipientes apropriados, para posterior incineração sob controle do Grupo de Gerenciamento de Resíduos (GGR) da Coordenadoria Geral da Universidade (CGU) da UNICAMP, de modo a respeitar as normas de Biossegurança e Controle de Qualidade.

### **3.6. Análise estatística**

Os dados foram tabulados para obtenção das médias de recuperação de parasitos pelo procedimento FAD, amparando-se em números de parasitos flotados e não flotados, por meio da identificação em microscopia óptica e contagem manual. Os ensaios de FAD foram

feitos em triplicata para obtenção de média e desvio padrão do número de parasitos recuperados. Os resultados das médias percentuais de parasitos recuperados na região flotada nos ensaios Controle foram comparadas com os ensaios Testes por meio do teste paramétrico bilateral *t* de *Student* com intervalo de confiança de 95%.

Para a validação laboratorial (intralaboratorial) amostras triadas pelo exame direto foram utilizadas na aplicação simultânea da técnica *TF-Test Conventional* (9) e do protocolo técnico com a FAD após padronização dos parâmetros ótimos obtidos em fase experimental. A somatória dos resultados positivos obtidos pelo exame direto, técnica de *TF-Test* e protocolo operacional do sistema de FAD foi registrada como resultado *Gold Standard* (Padrão Ouro). Estes resultados foram comparados de maneira a avaliar a sensibilidade (75,76), especificidade (77), concordância *Kappa* (*k*) (78) e suas classificações como: Quase Perfeita, Substancial, Moderada, Fraca e Pobre (75,76,79) O *software* utilizado para as avaliações estatísticas foi o *BioEstat* 5.3, versão *Windows*® 8. Para a avaliação comparativa de protocolos técnicos de *TF-Test* e FAD, as amostras processadas por ambas as técnicas foram avaliadas às cegas por dois avaliadores especialistas em diagnóstico de parasitos intestinais.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. *Protótipo de testes laboratoriais de FAD*

Nas primeiras avaliações para com o protótipo de FAD verificamos a atuação do motor de compressão de ar com 85 Watts (W) de potência e vazão de ar de 19 L/min. Este componente não resistiu em manter compressão da câmara de saturação em uma pressão constante de 5 bar. No entanto, com a aplicação de um motor de compressão de ar com 90 W de potência, observamos que sua capacidade de vazão volumétrica (39 L/min) possibilitou a compressão contínua de 5 bar. Mesmo assim, após 15 minutos de compressão constante, notamos um aquecimento externo da superfície deste compressor. Essa motorização apresentou ruído de 75dB aferido com decibelímetro *Sound Meter*® há 1 metro de distância em ambiente fechado. Para a compressão do ar e devido ao aquecimento da superfície do motor os tubos de poliuretano de 0.75 mm de espessura apresentaram dilatação na espessura e foram trocados por tubos de 1 mm, os quais demonstraram maior resistência à temperatura e pressão.

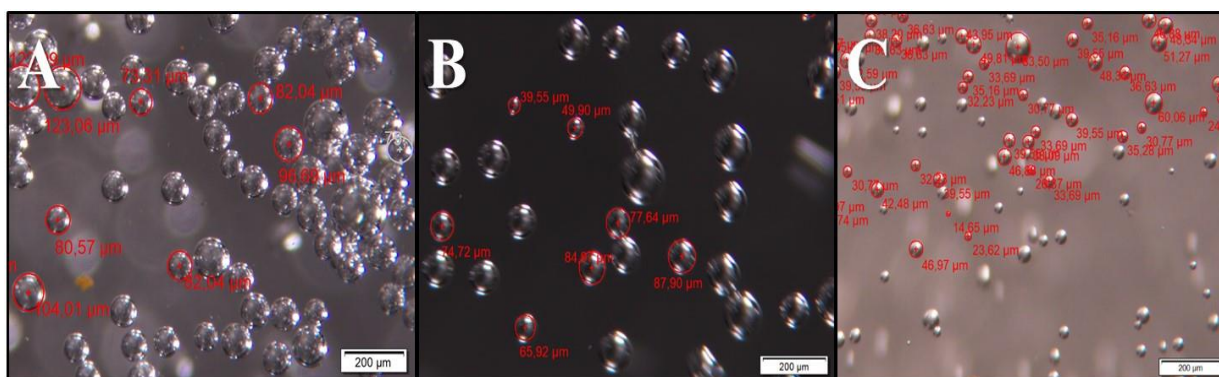
A câmara de saturação foi desenvolvida inicialmente com tubo de acrílico de 6 mm de espessura de parede. Entretanto, a parede desse tubo apresentou desgaste após 12 meses de uso constante e consecutivo contato com surfactantes, limpeza com álcool etílico e água corrente, que ocasionou no rompimento do tubo. Com isto, a câmara foi redimensionada com tubo de 10 mm de espessura e não houve mais danos a esta estrutura.

A disposição da válvula tipo agulha de despressurização nas colunas de flotação possibilitou à formação e elevação das microbolhas em seu interior. Na parte inferior da base da coluna possui uma válvula esfera para o esvaziamento que permite a colheita da suspensão como amostra não flotada nos ensaios de FAD. Estes ajustes realizados ao protótipo inicial deste estudo apresentaram segurança no uso contínuo referente aos desgastes e danos dos componentes.

### 4.2. *Dimensões de microbolhas geradas pelo protótipo FAD*

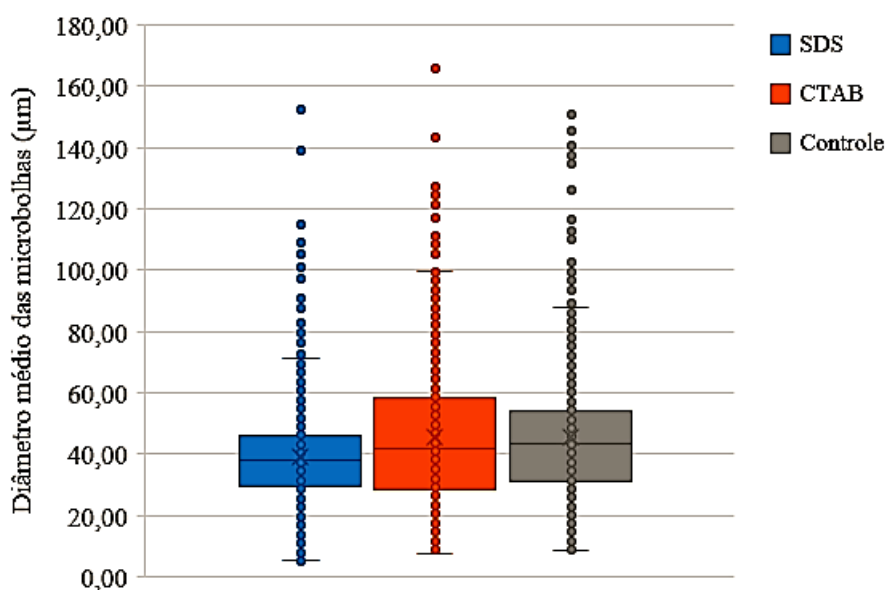
As distribuições dos diâmetros das microbolhas foram avaliadas em função do uso de surfactantes no líquido saturado. Três ensaios foram conduzidos para verificar o diâmetro das microbolhas sendo que um ensaio não foi adicionado surfactante (Controle), e outros dois ensaios foram realizados com o uso de surfactantes (CTAB 10% e SDS 15%). Em cada ensaio

foram registradas 54 imagens para cada parâmetro físico-químico avaliado que permitiu a medição de 1.000 microbolhas aleatoriamente (**Figura 14**).



**Figura 14** - Imagens de microbolhas geradas pelo sistema de FAD. (A) Sem surfactante; (B) com surfactante CTAB 10% e (C) com surfactante SDS 15%. Aumento de 10 vezes em estereomicroscópio.

A seguir apresentamos o gráfico *Boxplot* contendo os valores de mínimo-máximo, interquartis, mediana e *outliers* da distribuição de diâmetro de microbolhas geradas no Controle e com os surfactantes aniônico e catiônico (**Figura 15**). As microbolhas geradas com a adição de SDS apresentaram menor diâmetro quando comparadas às microbolhas dos ensaios Controle e com o uso de CTAB ( $p < 0.05$ ). Apesar da diferença observada, as faixas de diâmetro de microbolhas produzidas nas três condições propostas não interferiram no processo de flotação das amostras em estudo.



**Figura 15** - *Boxplot* da distribuição do diâmetro das microbolhas produzidas pela FAD com surfactantes SDS 15%, CTAB 10% e Controle.

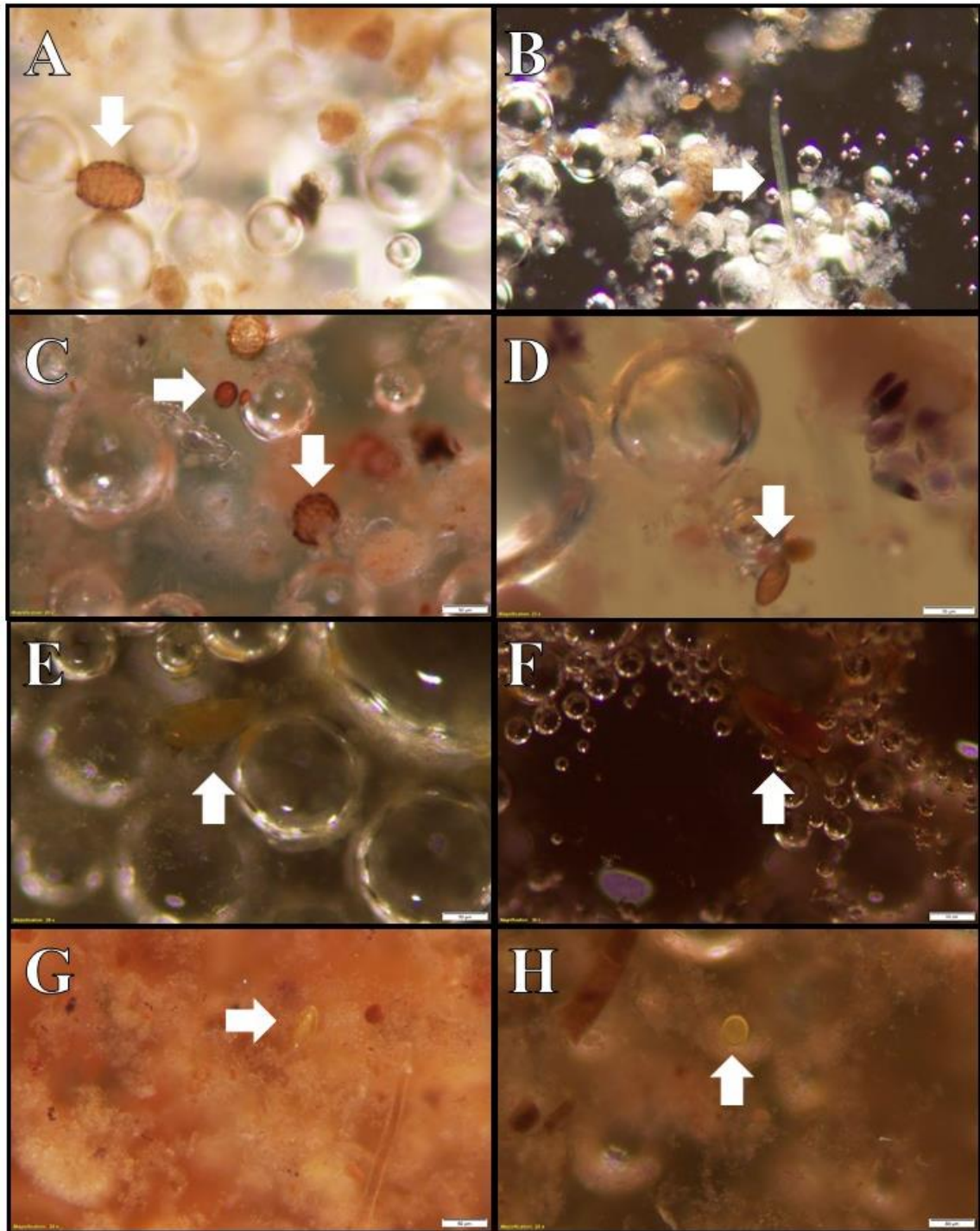
A distribuição do diâmetro das microbolhas produzidas pelo sistema de FAD (Controle – sem surfactante), conforme aplicado neste estudo está disposta na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Avaliação do diâmetro das microbolhas geradas no sistema laboratorial de FAD com parâmetros físico-químicos controlados (5 bar; pH 7; Temperatura 22° C)

| Categoria                | FAD   |       |
|--------------------------|-------|-------|
|                          | N     | %     |
| <b>0 - 50 µm</b>         | 280   | 28,00 |
| <b>51 - 100 µm</b>       | 515   | 51,50 |
| <b>101 - 150 µm</b>      | 170   | 17,00 |
| <b>151 - 200 µm</b>      | 25    | 2,50  |
| <b>201 - 250 µm</b>      | 5     | 0,50  |
| <b>&gt; 250µm</b>        | 5     | 0,50  |
| <b>Total</b>             | 1.000 | 100   |
| <b>Número de imagens</b> | 54    |       |
| <b>Média (µm)</b>        | 74,00 |       |
| <b>Mediana (µm)</b>      | 66,39 |       |

#### **4.3. Interação microbolha-parasitos (Comprovação)**

Um total de seis espécies de helmintos foi identificado pela triagem em doze amostras positivas, as quais foram utilizadas separadamente para os registros de imagem por equipamento estereomicroscópio. Na **Figura 16** observa-se a captura dos parasitos pelos agregados formados entre microbolhas e estruturas parasitárias.



**Figura 16** - Imagens de parasitos aderidos em microbolhas produzidas pela FAD, indicados nas setas. (A) Ovo de *A. lumbricoides*; (B) Larva de *S. stercoralis*; (C e D) Ovos de *T. trichiura*, *A. lumbricoides* e *Taenia* spp.; (E e F) Ovos de *S. mansoni*; (G) Ovo de *E. vermicularis*; e, (H) Ovo de *Taenia* spp.

Em todos os doze ensaios de FAD foi possível observar parasitos aderidos em microbolhas na camada superior (região de interesse) da coluna de flotação. Os surfactantes não foram utilizados na câmara de saturação para a formação das microbolhas nestes ensaios. Com isso, o contato superficial entre microbolhas e estruturas parasitárias foram eficazes na adesão com somente a utilização dos parâmetros da FAD.

#### **4.4. Teste de Surfactantes/Concentração**

Nesta avaliação de recuperação de parasitos foram selecionados dois tipos de surfactantes (SDS e CTAB) para modificação de microbolhas. Com isto, três concentrações de cada surfactante foram preparadas, sendo o SDS a 1%, 10% e 15% e CTAB a 1%, 5% e 10%, para diluição na água presente na câmara de saturação. Os testes de flotação nestas concentrações foram realizados com diferentes amostras fecais contendo cistos de *G. duodenalis* e ovos e larvas de *A. lumbricoides* e *S. stercoralis*, respectivamente. Neste experimento foram contados manualmente 157.392 cistos, 25.057 ovos e 22.706 larvas dos acima mencionados parasitos por meio da microscopia óptica de luz convencional. O percentual obtido da média dessas estruturas parasitárias no conteúdo flotado e não flotado dos ensaios estão apresentados nas **Tabelas 2 e 3**.

O uso de surfactante recuperou maior número de parasitos no conteúdo flotado (*G. duodenalis* – 48%; *A. lumbricoides* – 89% e *S. stercoralis* 96%) quando se utilizou CTAB 5 e 10%. Os resultados de recuperação com uso de SDS 15% foram superiores no conteúdo não flotado (*G. duodenalis* – 68%; *A. lumbricoides* – 77% e *S. stercoralis* – 71%) (**Apêndice 2**). Uma menor quantidade de pequenas impurezas foi observada nas lâminas preparadas do conteúdo não flotado dos ensaios com SDS 15% especialmente quando comparadas com as imagens de lâminas preparadas do conteúdo flotado dos ensaios de CTAB 5% (**Figura 17 e 18**) com o uso das mesmas amostras em ambos os testes.

**Tabela 2.** Resultados obtidos na recuperação de *G. duodenalis*, *A. lumbricoides* e *S. stercoralis* em função das concentrações do surfactante SDS nas regiões flotadas e não flotadas do sistema de FAD

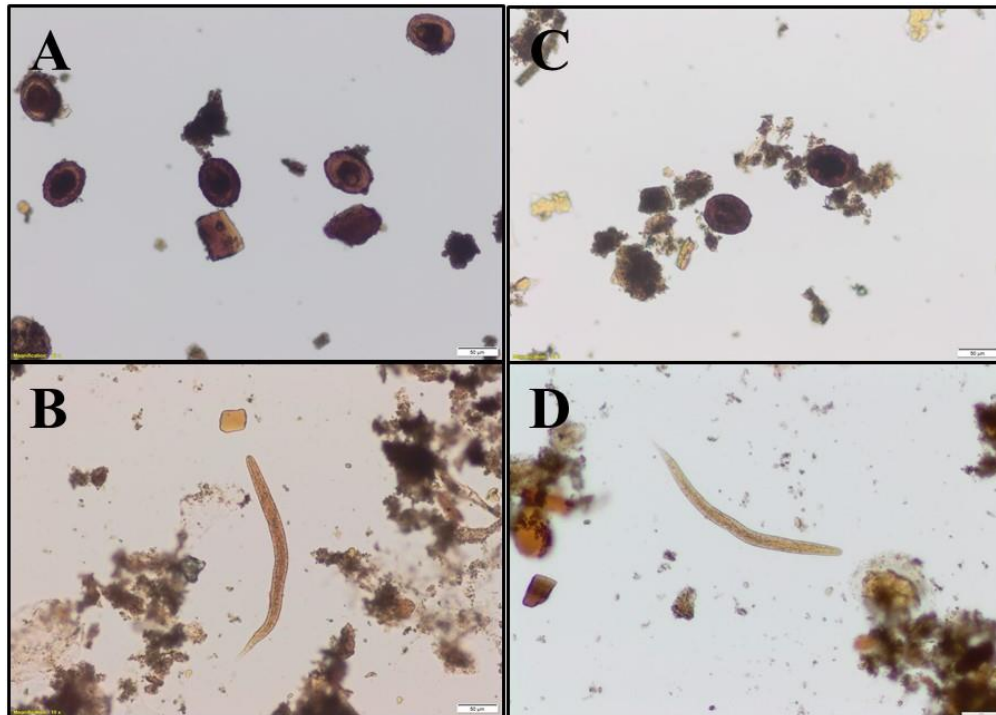
| SDS                  |         | Média de cistos, ovos e larvas |            |                |                        |            |                |                       |            |                |
|----------------------|---------|--------------------------------|------------|----------------|------------------------|------------|----------------|-----------------------|------------|----------------|
|                      |         | <i>G. duodenalis</i>           |            |                | <i>A. lumbricoides</i> |            |                | <i>S. stercoralis</i> |            |                |
|                      |         | Não Flotado                    | Flotado    | <i>p</i> valor | Não Flotado            | Flotado    | <i>p</i> valor | Não Flotado           | Flotado    | <i>p</i> valor |
| <b>Controle (0%)</b> | Média % | 59,88±1,81                     | 40,12±3,51 |                | 28,81±4,46             | 71,19±4,64 |                | 9,18±1,02             | 90,82±2,05 |                |
| <b>1%</b>            | Média % | 67,94±14,72                    | 32,06±1,22 | 0,147          | 60,11±1,32             | 39,89±8,28 | 0,001*         | 78,55±3,93            | 21,45±5,77 | 0,001*         |
| <b>10%</b>           | Média % | 66,79±6,70                     | 33,21±1,87 | 0,183          | 64,71±4,52             | 35,29±2,77 | 0,015*         | 73,42±1,76            | 26,58±0,74 | 0,001*         |
| <b>15%</b>           | Média % | 68,51±2,10                     | 31,49±2,02 | 0,081          | 77,18±6,59             | 22,82±3,40 | 0,036*         | 71,61±9,15            | 28,39±2,51 | 0,003*         |
| <i>Total %</i>       |         | 66,60                          | 33,40      |                | 57,11                  | 42,89      |                | 68,11                 | 31,89      |                |

\* valor  $p < 0,05$

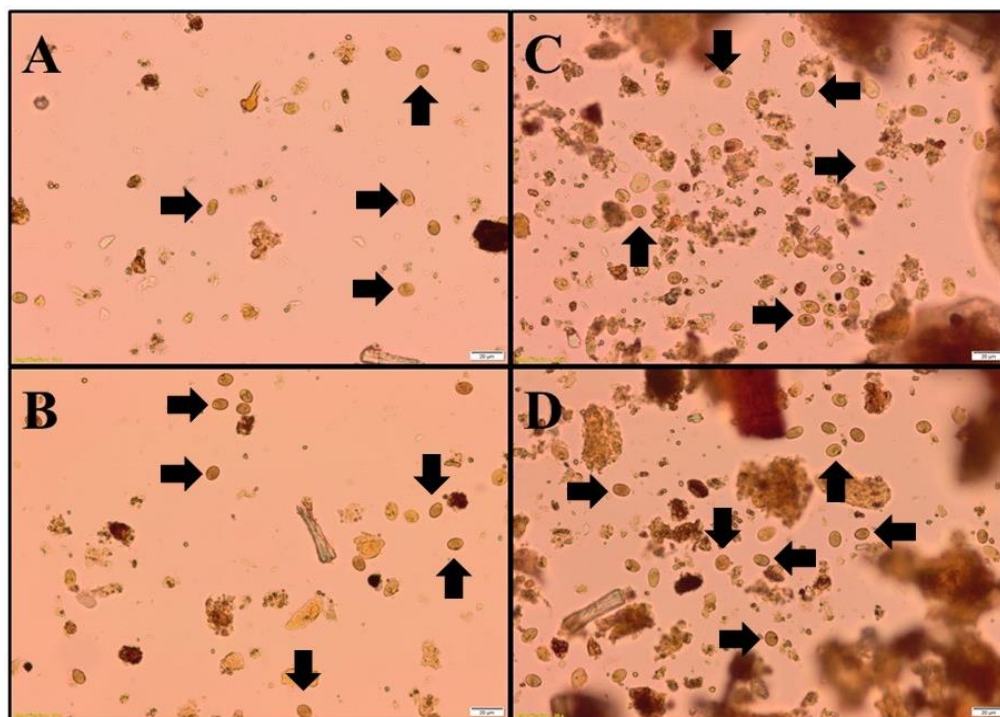
**Tabela 3.** Resultados obtidos na recuperação de *G. duodenalis*, *A. lumbricoides* e *S. stercoralis* em função das concentrações do surfactante CTAB nas regiões flotadas e não flotadas do sistema de FAD

| CTAB                 |         | Média de cistos, ovos e larvas |            |                |                        |             |                |                       |             |                |
|----------------------|---------|--------------------------------|------------|----------------|------------------------|-------------|----------------|-----------------------|-------------|----------------|
|                      |         | <i>G. duodenalis</i>           |            |                | <i>A. lumbricoides</i> |             |                | <i>S. stercoralis</i> |             |                |
|                      |         | Não Flotado                    | Flotado    | <i>p</i> valor | Não Flotado            | Flotado     | <i>p</i> valor | Não Flotado           | Flotado     | <i>p</i> valor |
| <b>Controle (0%)</b> | Média % | 64,42±10,88                    | 35,58±4,77 |                | 24,64±3,67             | 75,36±4,13  |                | 7,03±1,82             | 92,97±5,34  |                |
| <b>1%</b>            | Média % | 61,04±12,91                    | 38,96±0,51 | 0,597          | 12,10±1,34             | 87,90±15,06 | 0,058          | 42,36±3,81            | 57,64±10,62 | 0,053          |
| <b>5%</b>            | Média % | 51,79±1,87                     | 48,21±2,38 | 0,079          | 11,00±1,76             | 89,00±8,84  | 0,150          | 3,19±0,26             | 96,81±4,57  | 0,338          |
| <b>10%</b>           | Média % | 51,56±0,53                     | 48,44±1,75 | 0,079          | 11,93±2,05             | 88,07±4,09  | 0,245          | 8,74±1,18             | 91,26±2,04  | 0,799          |
| <i>Total %</i>       |         | 59,13                          | 40,87      |                | 14,28                  | 85,72       |                | 18,82                 | 81,18       |                |

\* valor  $p < 0,05$



**Figura 17** – (A – B) Campo visual de lâminas contendo ovos e larvas de helmintos recuperados de material flotado com uso de CTAB 5%; (C – D). Campo visual de lâminas contendo mesmas estruturas de helmintos, porém, recuperados de material não flotado com uso de SDS 15%.



**Figura 18** – (A – B) Campo visual de lâminas preparadas com materiais flotado e (C – D) não flotado contendo cistos de *G. duodenalis* (setas), sem uso de surfactante.

#### 4.5. *Recuperação de parasitos com SDS 15% e CTAB 10%*

O Experimento 1 permitiu observar que os maiores níveis de recuperação das três espécies (*G. duodenalis*, *A. lumbricoides* e *S. stercoralis*) foram obtidos tanto na região não flotada (sedimento e suspensão) com o uso de SDS 15%, como na região flotada (sobrenadante) com o surfactante CTAB 10%. Tendo em vista estes resultados, conforme **Tabela 4**, foram realizados uma série de testes em triplicatas de amostras contendo mais sete espécies de parasitos intestinais, respeitando o método e parâmetros fixados no protocolo operacional de ensaios da FAD.

Nos testes de reprodução de ensaios da FAD, foram avaliados visualmente a eliminação de impurezas fecais por meio de imagens do campo visual obtidas das lâminas preparadas de cada teste e o percentual de recuperação dos parasitos nas regiões de interesse da coluna de flotação. Apesar do reagente SDS auxiliar na diminuição de impurezas fecais da amostra e ter satisfatória (>50%) concentração de parasitos, o mesmo concentrou parasitos em menores proporções quando comparado ao surfactante CTAB no conteúdo flotado (**Tabela 4**), exceto na recuperação em material não flotado de cistos de *G. duodenalis* (48%) e ovos de *S. mansoni* (66%). O percentual de recuperação de parasitos no teste Controle, demonstrou oscilação na recuperação parasitária conforme a espécie avaliada.

O fluxograma apresentado no **Apêndice 3** demonstra o desenho experimental traçado com o resumo dos principais resultados obtidos. As imagens obtidas dos campos visuais das lâminas de microscopia obtidas dos conteúdos flotado e não flotado demonstram uma maior quantidade de impurezas fecais contidas no conteúdo flotado com o surfactante CTAB 10% (**Apêndice 3**).

**Tabela 4.** Avaliação da recuperação de dez espécies de parasitos intestinais no teste Controle e testes com uso de surfactantes SDS 15% e CTAB 10% das regiões flotada e não flotada obtidos na coluna de flotação

| Espécie                | Média Percentual de cistos, ovos e larvas |             |             |             |             |             |
|------------------------|-------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                        | Controle                                  |             | SDS 15%     |             | CTAB 10%    |             |
|                        | Flotado                                   | Não Flotado | Flotado     | Não Flotado | Flotado     | Não Flotado |
| <i>G. duodenalis</i>   | 36                                        | 64          | 32          | 68          | 48          | 52          |
| <i>E. coli</i>         | 36                                        | 64          | 40          | 60          | 65          | 35          |
| <i>A. lumbricoides</i> | 75                                        | 25          | 23          | 77          | 88          | 12          |
| <i>S. stercoralis</i>  | 93                                        | 7           | 28          | 72          | 91          | 9           |
| <i>H. nana</i>         | 64                                        | 36          | 27          | 73          | 92          | 8           |
| <i>E. vermicularis</i> | 70                                        | 30          | 36          | 64          | 89          | 11          |
| Ancilostomídeos        | 50                                        | 50          | 35          | 65          | 78          | 22          |
| <i>Taenia</i> spp.     | 55                                        | 45          | 19          | 81          | 82          | 18          |
| <i>S. mansoni</i>      | 44                                        | 56          | 22          | 78          | 66          | 34          |
| <i>T. trichiura</i>    | 48                                        | 52          | 23          | 79          | 82          | 18          |
| <b>Total %</b>         | <b>57,1</b>                               | <b>42,9</b> | <b>28,5</b> | <b>71,7</b> | <b>78,1</b> | <b>21,9</b> |
| Desvio Padrão          | ±17,4                                     | ±17,4       | ±6,62       | ±6,81       | ±13,5       | ±13,5       |

#### 4.6. Taxa de volume saturado

Ao avaliar as taxas de volume saturado de 5%, 10% e 20% constatamos que os resultados da taxa de 10% apresentaram mais uniformidade e valores superiores no desempenho de recuperação de oito espécies de parasitos obtidos nesta etapa de estudo, conforme demonstrado na **Tabela 5**.

**Tabela 5** - Percentual de recuperação parasitária em conteúdo flotado em função das taxas de volume saturado de 5% 10% e 20% com o uso de Controle e surfactantes SDS 15% e CTAB 10%

| Espécie                | Taxa de Volume Saturado |       |       |                 |       |       |                 |       |       |
|------------------------|-------------------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|
|                        | 5%                      |       |       | 10% (Controle)  |       |       | 20%             |       |       |
|                        | Sem surfactante         | SDS   | CTAB  | Sem surfactante | SDS   | CTAB  | Sem surfactante | SDS   | CTAB  |
| <i>G. duodenalis</i>   | 41                      | x     | 30    | 40              | 31    | 48    | 22              | x     | 35    |
| <i>E. coli</i>         | 39                      | 34    | 39    | 36              | 40    | 65    | 38              | 46    | 59    |
| <i>A. lumbricoides</i> | 28                      | 21    | 56    | 71              | 23    | 88    | 26              | 23    | 83    |
| <i>H. nana</i>         | 28                      | 22    | 55    | 64              | 27    | 92    | 29              | 33    | 94    |
| <i>Taenia</i> spp.     | 31                      | 22    | 49    | 55              | 19    | 82    | 61              | 18    | 79    |
| <i>T. trichiura</i>    | 31                      | 24    | 45    | 48              | 23    | 82    | 50              | 23    | 86    |
| <i>S. stercoralis</i>  | 81                      | x     | 56    | 93              | 28    | 91    | 86              | x     | 92    |
| <i>E. vermicularis</i> | 57                      | x     | 53    | 70              | 36    | 89    | 75              | x     | 42    |
| Média Total %          | 41.80                   | 24.86 | 47.95 | 59.72           | 28.48 | 79.68 | 48.26           | 28.65 | 71.07 |

#### 4.7. Teste com sistema de agulha

O novo sistema de inserção de microbolhas por meio de agulha inserida no interior da coluna de flotação de FAD permitiu avaliar a viabilidade técnica deste dispositivo para o processamento das amostras fecais e separação de sete enteroparasitos de interesse diagnóstico com uso de surfactante CTAB 10% como modificador de microbolhas. Na avaliação comparativa entre o dispositivo de inserção de microbolhas do tipo agulha e o protótipo original não houve diferença estatística ( $p > 0.05$ ) entre as médias percentuais de parasitos contados no conteúdo flotado dos ensaios de FAD (**Tabela 6**).

**Tabela 6** - Percentual de recuperação de parasitos em relação ao protótipo original FAD (Controle) *versus* o protótipo FAD com dispositivo de inserção de microbolhas do tipo agulha

| Volume saturado | Espécie                | Controle<br>CTAB | Sistema Agulha<br>CTAB |
|-----------------|------------------------|------------------|------------------------|
| 10%             | <i>G. duodenalis</i>   | 48               | 34                     |
|                 | <i>A. lumbricoides</i> | 88               | 81                     |
|                 | <i>S. stercoralis</i>  | 91               | 92                     |
|                 | <i>Taenia</i> spp.     | 82               | 85                     |
|                 | <i>T. trichiura</i>    | 82               | 74                     |
|                 | <i>S. mansoni</i>      | 81               | 82                     |
|                 | <i>E. vermiculares</i> | 89               | 72                     |
| <i>p</i> valor  |                        | <i>p</i> = 0.109 |                        |

#### 4.8. Volume da coluna de flotação

Nos testes de avaliação da coluna de flotação, os resultados anteriores de parasitos flotados obtidos pela coluna do protótipo original (50 mL) foram comparados com os resultados obtidos utilizando o sistema de agulha em coluna de 10 mL, por meio do uso de surfactante CTAB 10% (**Tabela 7**). Não foi observada diferença estatística ( $p > 0.05$ ) entre as médias percentuais dos ensaios de FAD com estas duas colunas.

**Tabela 7** - Percentual de recuperação de protótipo FAD com uso de surfactante CTAB 10% em colunas de flotação de 50 mL *versus* 10 mL

| Volume saturado | Espécie                | Tubo 50 mL<br>(Controle) | Tubo 10 mL |
|-----------------|------------------------|--------------------------|------------|
| 10%             | <i>G. duodenalis</i>   | 34                       | 39         |
|                 | <i>E. coli</i>         | 65                       | 49         |
|                 | <i>A. lumbricoides</i> | 81                       | 82         |
|                 | <i>S. stercoralis</i>  | 92                       | 83         |
|                 | <i>S. mansoni</i>      | 82                       | 73         |
|                 | <i>E. vermiculares</i> | 72                       | 60         |
| <i>p</i> valor  |                        | <i>p</i> = 0.095         |            |

#### **4.9. Protocolo operacional de FAD para o uso no diagnóstico enteroparasitos**

A partir dos resultados apresentados referentes a efetiva recuperação de estruturas parasitárias em amostras fecais humanas com o uso de sistema de FAD, definimos o seguinte protocolo técnico para os testes de validação diagnóstica.

A câmara de saturação foi preenchida com água tratada no volume de 500 mL contendo 2,5 mL de surfactante CTAB, e pressurizada sob a pressão de 5 bar com o tempo de saturação de 15 minutos. O material biológico foi colhido em uma porção de 200 mg em cada um dos três tubos de colheita do kit parasitológico *TF-Test*, em dias alternados, para avaliar uma quantidade total de aproximadamente 600 mg de amostra fecal. Os tubos coletores foram acoplados em um conjunto de filtro contendo malha filtrante com orifícios de 500 µm de diâmetro. Este conjunto foi submetido a agitação por 10 segundos em equipamento Vórtex, que promoveu a filtração mecânica do conteúdo fecal. O volume de 9 mL de amostra filtrada foi transferido para um tubo de ensaio (10 mL). O sistema de despressurização foi inserido por meio de um dispositivo na parte inferior do tubo de 10 mL e o volume de 1 mL de fração saturada (10%) foi injetada no interior deste mesmo tubo. Após o tempo de 1 minuto da ação das microbolhas, um volume de 2 mL da amostra flotada foi resgatado com o uso de pipeta *Pasteur* da região sobrenadante do tubo e transferido para um microtubo *ependorf* contendo 500 µL de álcool etílico. Para a preparação do esfregaço fecal, a amostra resgatada foi homogeneizada com pipeta *Pasteur* no microtubo e transferida para uma lâmina de microscopia. Logo após, o esfregaço recebeu o volume de 50 µL de solução corante de Lugol para observação em microscópio óptico de luz convencional.

#### **4.10. Validação laboratorial**

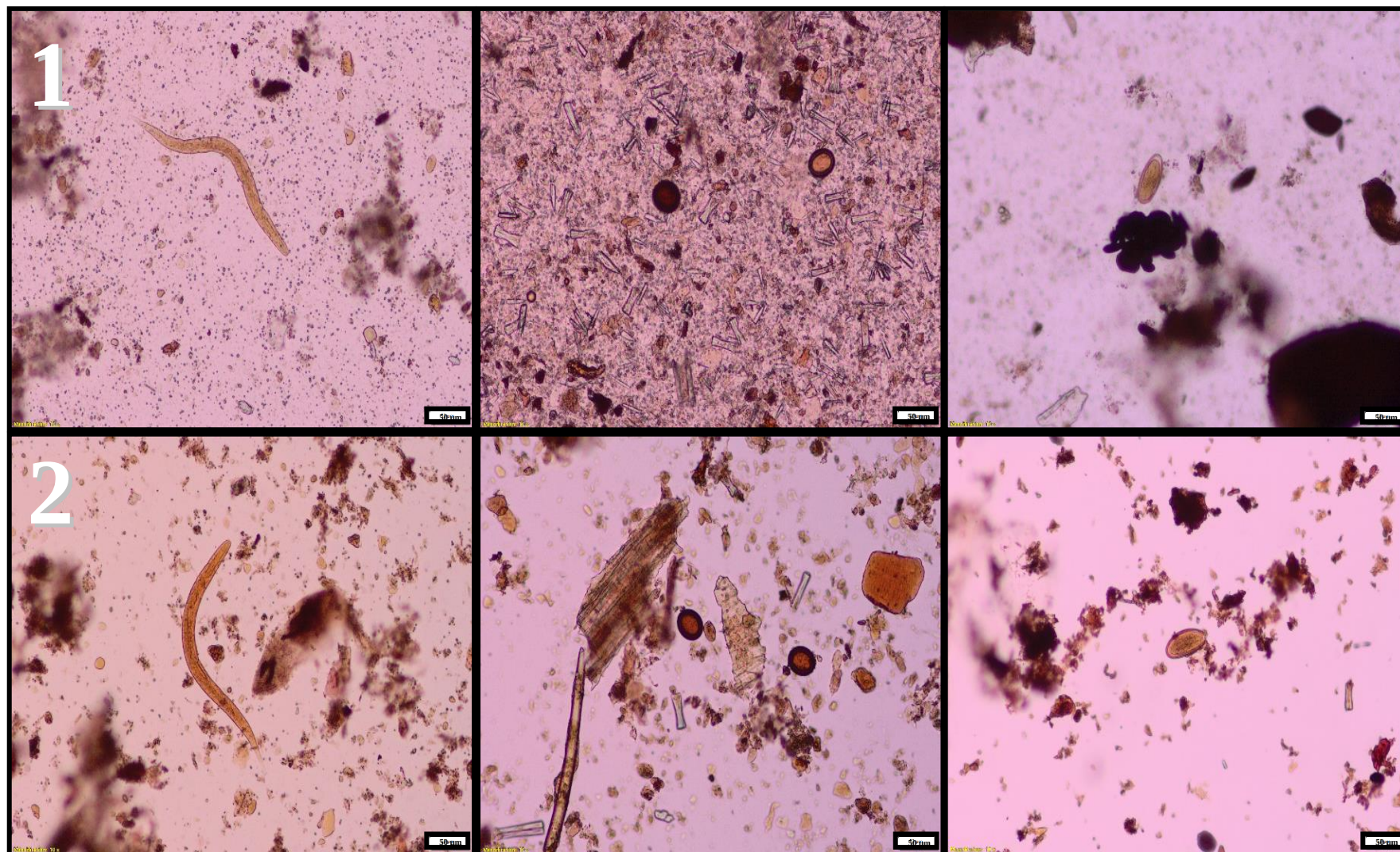
Nos testes comparativos foram diagnosticadas 58 amostras positivas e 15 amostras negativas na somatória dos casos pelos três métodos diagnósticos adotados. Um total de 12 espécies foram detectadas sendo 7 espécies de helmintos e 5 protozoários. Os resultados dos testes comparativos estão dispostos na **Tabela 8**, que demonstram a Acurácia de 93% na detecção parasitária pelo protocolo técnico de FAD, e concordância “Substancial” pelo teste de *Fleiss Kappa* em relação ao Padrão Ouro definido no estudo.

**Tabela 8** – Avaliação comparativa de desempenho entre os princípios técnicos de exame direto, *TF-Test* e FAD)

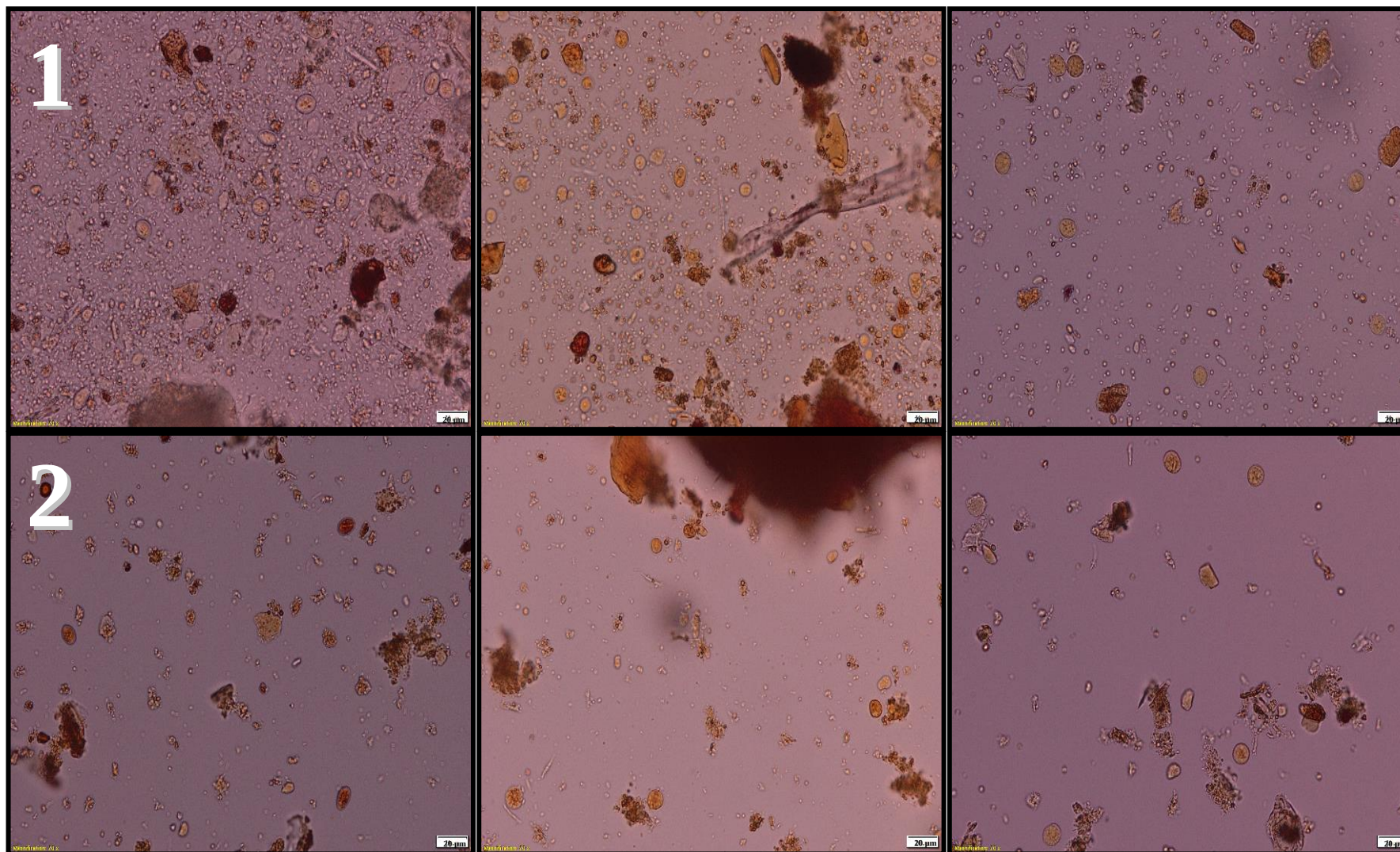
| Resultados          | Exame direto       | TF-Test               | FAD                   | Total casos (GS) |
|---------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|
| Verdadeiro Positivo | 47                 | 52                    | 53                    | 58               |
| Verdadeiro Negativo | 15                 | 15                    | 15                    | 15               |
| Falso Negativo      | 11                 | 6                     | 6                     | 0                |
| Falso Positivo      | 0                  | 0                     | 0                     | 0                |
| Sensibilidade       | 81,03              | 89,66                 | 91,38                 | -                |
| Especificidade      | 100,00             | 100,00                | 100,00                | -                |
| Acurácia            | 85%                | 92%                   | 93%                   | -                |
| <i>Kappa</i>        | 0,54<br>(Moderado) | 0,63<br>(Substancial) | 0,64<br>(Substancial) | -                |

(GS) *Gold Standard*

Os resultados de positividade obtidos demonstraram que a aplicação de FAD obteve similaridade diagnóstica com a técnica convencional de *TF-Test* (**Tabela 8**). A FAD possibilitou a eliminação de microimpurezas quando comparada às fotomicrografias obtidas pela técnica *TF-Test*, com a mesma amostra em ambos procedimentos (**Figura 19 e 20**).



**Figura 19** – Imagens contendo ovos e larvas de helmintos em amostras processadas pelas técnicas *TF-Test* (linhas 1) e *FAD* (linhas 2).



**Figura 20** – Imagens contendo cistos de protozoários em amostras processadas pelas técnicas *TF-Test* (linhas 1) e *FAD* (linhas 2).

## 5. DISCUSSÃO

Nós demonstramos por meio de fotomicrografias a interação de estruturas de parasitos intestinais com microbolhas de ar geradas por uma unidade prototípica laboratorial de FAD. O contato de adesão entre superfície das microbolhas e parasitos pode ser observado na **Figura 16**, apesar de não podermos esclarecer quais as forças físico-químicas atuantes neste processo de adesão. Os registros deste trabalho com o uso de FAD sem surfactante demonstraram moderada ligação natural de superfície de contato entre parasitos e microbolhas.

No processamento de FAD, a interação superficial entre parasitos e microbolhas não apresentou qualquer tipo de dano às morfologias das espécies dentre helmintos e protozoários (**Figura 16**). Vale ressaltar que algumas técnicas parasitológicas convencionais empregadas no exame de fezes promovem alterações morfofisiológicas permanentes às estruturas parasitárias, e com isso podem interferir negativamente no resultado desta modalidade de diagnose (15,33,35,38,80,81). Estes efeitos indesejáveis não ocorreram nos ensaios de FAD que apresentou estruturas de parasitos intactas.

O protótipo de FAD promoveu a formação de microbolhas com dinâmica de flotação apropriada para a separação de partículas assim como os modelos utilizados nos estudos de Reali et al. (62) Rodrigues e Rubio (82) e Amaral Filho et al. (61). As mudanças técnicas dos componentes do sistema de FAD possibilitaram o desenvolvimento de uma unidade prototípica que atestou aos critérios de segurança, praticidade e compactação para uso em rotina laboratorial.

Com as fotomicrografias das microbolhas geradas pelo sistema de FAD obtidas e avaliadas por *software*, notamos que a faixa de diâmetro médio das microbolhas apresentado na **Tabela 1** e **Figura 15** (18 – 100  $\mu\text{m}$ ) condiz com o diâmetro encontrado em outros estudos para a efetiva remoção de partículas suspensas em meio líquido (58,63,83). O uso do surfactante CTAB não alterou significativamente o diâmetro médio das microbolhas, diferente do SDS que reduziu o diâmetro médio das microbolhas ( $p < 0.05$ ). As imagens e as medidas de diâmetros de microbolhas com o uso dos surfactantes SDS e CTAB corroboram com os resultados apresentados no estudo de Zhang e Guiraud (84). Esses surfactantes são reagentes tensoativos capazes de reduzir a tensão superficial das interfaces líquido-gás que podem favorecer na diminuição da coalescência entre as microbolhas, manter a uniformidade no diâmetro médio das mesmas e conservar a espuma sobrenadante na solução (57,69,85).

A avaliação do desempenho de recuperação parasitária, de acordo com os surfactantes e concentrações utilizadas nos testes com amostras contendo os helmintos *A. lumbricoides* e *S. stercoralis* e o protozoário *G. duodenalis*, permitiu verificar que as maiores concentrações de CTAB (10%) e SDS (15%) obtiveram os maiores índices de recuperação no conteúdo flotado com CTAB e conteúdo não flotado com SDS.

Nas Tabelas 2 e 3 pode ser observada uma maior concentração de cistos de *G. duodenalis* (59,13% e 66,60%) na suspensão fecal não flotada com o uso de SDS. Contudo, nos ensaios com CTAB foram observadas recuperações de 48,21% e 48,44% desses cistos no material flotado quando utilizadas as concentrações de 5 e 10% desse surfactante, respectivamente. Esses resultados justificam a necessidade de uma melhoria na flotação com o uso de CTAB, porém, este desempenho de flotação não foi observado nos ensaios com o SDS. Os testes não demonstraram a captura da espécie *G. duodenalis* superior a 50% no processo de flotação. Com um percentual máximo de 48% de cistos encontrados no conteúdo flotado com uso de CTAB 10%, a maior quantidade de cistos detectada foi de 68% no conteúdo não flotado com uso de SDS 15%. Os helmintos *A. lumbricoides* e *S. stercoralis* foram recuperados em 88% e 91% respectivamente no conteúdo flotado com uso de CTAB 10%. Estes resultados demonstram que o maior percentual de flotação dos parasitos obtido pelo surfactante catiônico provavelmente se deve mediante uma reação de adesão com as microbolhas estimulada pela redução das forças repulsivas da carga superficial de microbolhas e parasitos (69). De maneira oposta, o surfactante aniônico inibiu a flotabilidade das espécies avaliadas, sobretudo ao considerar que os resultados dos testes Controle apresentaram maiores índices de recuperação parasitária no conteúdo flotado em relação aos testes com as concentrações de SDS (**Tabela 2**).

Diferente das técnicas parasitológicas aplicadas em outros estudos, o delineamento experimental em nosso trabalho permitiu verificar o percentual de perda real de estruturas parasitárias pelo processamento das amostras fecais, sobremaneira ao quantificarmos todos os helmintos nas regiões separadas pelo procedimento técnico (86). Kochanowski et al. (86), mencionam que fatores como a capacidade de ovos de helmintos em aderir às superfícies de tubos, espátulas, béqueres e propriedades das fezes podem influenciar na eficiência de recuperação de ovos em técnicas parasitológicas convencionais. Todos os parâmetros dos protocolos das técnicas parasitológicas devem ser avaliados em detalhes para

uma padronização criteriosa e uma validação laboratorial que se reproduza diante das diferentes condições da realidade de campo (20,86).

Além do desempenho de recuperação dos parasitos, simultaneamente observamos que a proporção de impurezas fecais registradas nas lâminas de microscopia foi similar em ambas as amostras obtidas do conteúdo flotado com uso de CTAB 10% e conteúdo não flotado com uso de SDS 15%. O emprego de surfactantes favorece a agregação de impurezas em algumas estruturas parasitárias que ocasionalmente dificultou a identificação destes parasitos na leitura de microscopia (**Figura 17**).

Estudos confirmam a presença de carga superficial negativa de ovos de *Ascaris suum* (87), cistos de *G. duodenalis* e oocistos de *Cryptosporidium* spp. (88,89) que podem interagir com a polaridade dos surfactantes e favorecer a adesão desses parasitos com estruturas indesejáveis na lâmina de microscopia. Com isso, optamos em separar as alíquotas das amostras flotadas em tubos contendo 500 µL, com álcool etílico a 70% para a redução deste efeito de aglomeração das impurezas fecais e parasitos. Em nossos registros de imagens notamos que quanto mais impurezas fecais contidas na lâmina de microscopia mais estruturas parasitárias foram contadas. Apesar da menor recuperação de cistos de *G. duodenalis* no conteúdo flotado de FAD, sobretudo quando comparado a outras espécies avaliadas, estes cistos foram evidenciados nas imagens de microscopia e identificados com maior facilidade por estarem destacados e livres de impurezas fecais em seus entornos (**Figura 18**).

Nos Experimentos 1 e 2 nós demonstramos que o uso de surfactantes modificadores das microbolhas promoveu distintos desempenhos de recuperação dos parasitos nas duas regiões de interesse da coluna de flotação de FAD. Além da característica de mudança da carga superficial das microbolhas promovida pelos surfactantes, sugerimos que o dimensional das estruturas parasitárias pode ser um fator favorável às múltiplas adesões de microbolhas por possuírem maior área de contato superficial, como exemplo, os ovos e larvas de helmintos (50 - 450 µm) (3).

Com os dados demonstrados na **Tabela 4** verificamos uma concentração média maior (78.1%) de parasitos no conteúdo flotado com a aplicação de surfactante catiônico na câmara de saturação. Similar aos nossos achados, Oliveira et al. (83) apresentaram 95% de remoção de hidróxido de ferro ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ) em sistema de FAD com o uso do polímero catiônico *Superfloc C-448*, além de uma faixa de diâmetro de microbolhas de 10 a 230 µm (73 µm de diâmetro médio) com pressão saturação de 4 atm. Em estudo de Yap et al. (66) foi

demonstrado que polímeros catiônicos foram superiores em remoção de células de algas (*Microcystis aeruginosa*) com 98% de efetividade em comparação com o surfactante CTAB. Em estudos de Potocar et al. (90) e Liu et al. (91) a remoção de algas (*Chlorella vulgaris*) chegou a 90% e 86% com o uso de CTAB a 6.7mg/L e 20mg/L, mutuamente. Estes estudos corroboram com os nossos resultados ao verificarmos superioridade de organismos enteroparasitários concentrados no conteúdo flotado com a aplicação de surfactante CTAB, notadamente quando comparado aos valores obtidos com o surfactante SDS e sem surfactante modificador de microbolhas. A partir da satisfatória (acima de 50%) recuperação de 9 das 10 espécies de parasitos avaliados nesta etapa do estudo, optamos pelo uso do surfactante catiônico CTAB como padrão inicial para testes laboratoriais do protótipo de FAD. Avaliações futuras podem ser conduzidas com aplicação de polímeros, como exemplo, cloreto de polidialildimetilamônio (*polyDADMAC*), *Superfloc* ou surfactantes catiônicos como o cloreto de cetilperimidínio (CPC), dentre outros.

A flotação das espécies *G. duodenalis*, *E. coli*, *A. lumbricoides*, *Taenia* spp. e *E. vermicularis* com a taxa de volume saturado de 10% de água saturada inserida na coluna foi de 48%, 65%, 88%, 82% e 89% nesta ordem. Estes valores foram superiores ao obtido com 20% de volume saturado. Em 90% dos testes realizados (19/21) a diminuição de 10% para 5% de volume saturado implicou na diminuição de recuperação de parasitos flotados. Contudo, o desempenho oposto não foi observado uma vez que o aumento para 20% na taxa de volume saturado não ocasionou maior recuperação de parasitos em 52% das condições avaliadas (11/21). A inconstância no desempenho de recuperação parasitária ao aplicar 20% de volume saturado pode ter ocorrido devido ao volume de microbolhas promover a coalescência e gerar bolhas maiores e consequentemente o aumento das forças hidrodinâmicas internas (turbulência) da coluna de flotação e ocasionar o cisalhamento entre partículas e microbolhas, bem como observado em estudos de Pioltine e Reali (64). Faustino et al. (92) observaram ótima remoção de turbidez em amostras de afluente com alto teor de  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  com 10% a 12% de taxa de recirculação (volume saturado) e o aumento para 18% de volume saturado não repercutiu em maior remoção. Pioltine e Reali avaliaram as taxas de volume saturado de recirculação de 4%, 6% e 10% (4.5 bar de pressão) e relataram a concentração de massa de ar de 3.3 mg/L, 4.8 mg/L e 7.8 mg/L, respectivamente, com a formação de microbolhas mais adequada neste estudo para 6% de líquido saturado (64). Em conformidade com nossos resultados, Edzwald aponta que a recirculação de volume saturado

de 10% é usualmente aplicada em ensaios de FAD para tratamento e esta taxa volumétrica possui concentração de massa de ar de 8.7 mg/L com pressão de 5 bar (58).

O sistema de injeção por dispositivo de agulha foi avaliado quanto seu desempenho de recuperação de parasitos com a aplicação de FAD e surfactante CTAB 10%. Não foi observada diferença estatística ( $p>0.05$ ) na recuperação de parasitos entre o dispositivo de injeção de microbolhas do tipo agulha comparado com o dispositivo original do sistema da FAD. É importante ressaltar que, por existirem diversos modelos geradores de microbolhas em sistema de flotação (93), o dispositivo de injeção composto por um bico em formato de agulha (aço inoxidável) proposto neste estudo se difere das válvulas de despressurização do tipo agulha que foram utilizadas em ambos dispositivos de FAD (94).

A pressão utilizada na câmara de saturação e no dispositivo de injeção são fatores importantes na dinâmica de formação de microbolhas e consequentemente na efetiva flotação de sólidos em meio líquido (58,95). Estudos confirmam que a pressão de saturação a partir de 5 atm (5 bar – 500 kPa – 72.5 psi) tende a estabilizar o padrão de microbolhas, porém, o tipo de dispositivo de despressurização pode contribuir na redução da coalescência das bolhas e promover um fluxo contínuo e uniforme de microbolhas (82,96,97). Féris et al. concluíram que o efeito de diferentes difusores de microbolhas em um sistema tradicional de FAD para a remoção de  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  e turbidez otimizou o processo de flotação (57). Em nossas avaliações, o dispositivo de agulha inserido no interior da coluna otimizou o processo de flotação ao possibilitar múltiplos ensaios de FAD, em diversas colunas simultaneamente, além de simplificar a descontaminação do sistema (lavagem e limpeza) ao reduzir a área de contato com a amostra sem perda de efetividade diagnóstica.

As características da coluna de flotação são fundamentais ao propiciar condições físicas na zona de contato e hidrodinâmica favoráveis à estabilidade da ligação entre partícula de interesse e microbolha (58). Os desenvolvimentos de melhorias científicas e tecnológicas são amplamente conduzidas em pesquisas de tratamento de minérios e de águas residuárias para otimizar a remoção de partículas nos tanques e colunas de flotação (58,63,98). Em nosso estudo verificamos a recuperação de parasitos em colunas de flotação com volumes de 50 mL e 10 mL na FAD. Apesar de os resultados dos testes não terem apresentado diferença estatística ( $p>0.05$ ) entre as duas colunas, observamos uma diminuição de 9% na recuperação de parasitos com o uso da coluna de 10 mL.

A zona de contato das colunas e tanques de flotação possuem diversas variáveis, como exemplo, tempo de detenção das microbolhas, volume e altura que podem interferir na dinâmica de flotação, são alvos de investigação e modelagem matemática em estudos (58,99). Desta maneira, é possível inferir que ajustes no dimensional do tubo de ensaio (10 mL) utilizado como coluna de flotação pode otimizar a flotação de parasitos e propiciar a utilização de tubos descartáveis e compactos ao sistema de FAD.

Tendo em vista os resultados dos experimentos dos parâmetros da FAD avaliados em relação à recuperação de parasitos intestinais, o primeiro protocolo operacional de FAD foi padronizado com o intuito de processar amostras fecais para concentração e detecção parasitária. Em fase de testes de validação operacional, a FAD apresentou superioridade com índices de 91.38% de sensibilidade e 93% de acurácia comparados com a técnica convencional de *TF-Test* que apresentou 89.66% e 92%, respectivamente. Estes dois princípios técnicos obtiveram 100% de especificidade nos testes (**Tabela 8**). Nossos resultados concordam com os valores obtidos por Gomes et al. (9), ao relatarem 90.4% de sensibilidade média e 100% de especificidade em contraste com técnicas convencionais de sedimentação (21,22), centrifugo-flutuação (25) e termohidrotropismo positivo de larvas nematódeos (32). Apesar dos mesmos desempenhos diagnósticos percebidos nos índices de reprodutibilidade e eficácia diagnóstica (Sensibilidade, Acurácia e concordância *Kappa*), houve diferenças na qualidade das imagens obtidas pelas lâminas de microscopia processadas por *TF-Test* e FAD, conforme **Figuras 19 e 20**.

O resultado de concordância (**Tabela 8**) do procedimento de FAD referente ao *Gold Standard* foi classificado como Substancial com índice  $k=0.64$ . Em estudo de Carvalho et al., a técnica de *TF-Test Modified* obteve índice  $k=0.76$  (Substancial), de maneira similar aos nossos resultados (8). Santos et al. demonstram, com o desenvolvimento da técnica de *TF-Test Quantified*, a importância de realizar uma padronização técnica detalhada ao obterem o índice  $k=1.00$  (Quase Perfeito) (100). Neste estudo de Santos et al., o desenho experimental permitiu a execução de testes laboratoriais controlados para a quantificação da espécie *S. mansoni* em Ovos Por Grama (OPG) de fezes comparado com o exame total de 1 grama de fezes (Exame verdadeiro) e com a técnica de Kato-Katz (100).

Como para as demais técnicas parasitológicas, as amostras processadas pelas acima mencionadas técnicas de *TF-Test* apresentam mais detritos fecais em esfregaço de lâmina de microscopia, de modo a dificultar o encontro de parasitos e repercutir em

resultados falso-negativos (8). Em muitas situações estes detritos são fatores de confundimento, que por vezes interferem no resultado diagnóstico por se assemelharem a estruturas de parasitos, denominados de “pseudoparasitos ou pseudosimbiontes”, e assim repercutir nos resultados falso-positivos nos exames laboratoriais (3,8,19).

O protocolo operacional de FAD torna-se primordial ao diagnóstico mais preciso ao concentrar estruturas de parasitos com eliminação de detritos fecais. Convém ressaltar que quanto maior for a capacidade de concentração parasitária de um princípio técnico laboratorial, maior serão as chances do acerto diagnóstico (15,20). A sensibilidade de um exame das fezes pode estar associada ao desempenho na recuperação dos enteroparasitos, ao reduzir ou aumentar o número desses agentes na alíquota analisada, que pode interferir na probabilidade de facultar lâminas positivas em condições de baixa intensidade de infecção (9,29,101).

Outros avanços apresentados na FAD dizem respeito a eliminação da etapa de centrifugação, uso de solventes orgânicos (inflamáveis), ou soluções aquosas de elevadas densidades, nocivas à integridade dos parasitos. Manser et al. assumem que no procedimento de concentração com Formalina-Acetato de Etila, a polaridade apresentada pelo solvente Acetato de Etila reduz a emulsificação das gorduras presentes na amostra de maneira a ocasionar na melhor deposição dos ovos e detritos no sedimento comparado com o solvente Éter (20).

Diversos estudos apontam a necessidade de fomentar pesquisas que desenvolvam novas ferramentas que promovam a recuperação de estruturas parasitárias intestinais em fezes com maior acurácia diagnóstica (8,15,20,35) porém, com o emprego de princípios laboratoriais bem distantes do preconizado na FAD. Como exemplo, Teixeira et al. demonstraram a maior eficácia na recuperação de ovos de *S. mansoni* por meio do uso de esferas paramagnéticas e consequentemente detectando mais ovos do que a técnica de Kato-Katz (101). Rosa et al. apresentaram o uso de um princípio químico de Sistema Aquoso Bifásico (SAB) na separação de ovos de *A. lumbricoides* como alternativa de baixo custo operacional ao EPF (35).

As perspectivas de melhoria no diagnóstico parasitológico das fezes estão relacionadas à automatização desta modalidade de exame, que podem excluir o viés de interpretação do profissional de microscopia, resultar o diagnóstico por rede e imagem, e garantir uniformidade, velocidade e controle de qualidade da avaliação microscópica (102).

Em 2013, Suzuki et al. apresentaram um sistema, denominado DAPI, composto por protocolo parasitológico, microscópio óptico, com câmera digital e platina motorizada, controlado por computador e um conjunto de técnicas computacionais que detectam de maneira automatizada 15 espécies de parasitos intestinais de humanos (43).

Contudo, uma das dificuldades para a automatização na parasitologia clínica é devido a efetiva concentração dos parasitos com eliminação de detritos fecais e a manutenção da integridade morfológica das espécimes analisadas (103). A avaliação computacional pode acumular precisão em repetição de análise, velocidade e desempenho constantes, contanto que sejam fornecidas imagens com excelente qualidade e padronização, para minimizar as chances de erro na análise computacional (43,104). As fotomicrografias (**Figuras 19 e 20**) obtidas nos exames resultantes do processamento de FAD demonstraram avanço na qualidade de campo de imagem de lâmina de microscopia, que consequentemente pode implicar na otimização do exame parasitológico tanto na detecção manual quanto em uma perspectiva avaliação por análise computacional de imagens.

Diante disso, o protocolo operacional de FAD demonstrado neste trabalho pode ser aprimorado no sentido da automatização de todo procedimento, tendo em vista que ainda é usual a aplicação manual das técnicas parasitológicas nas rotinas de laboratório. A automatização no processamento da amostra mudaria a realidade do EPF por reduzir as variações ocorridas pelo erro humano. A FAD se torna uma ferramenta que pode se integrar ao DAPI e tornar o exame unificado e automatizado em todas as suas etapas. O sistema e protocolo operacional de FAD proposto nesta tese é uma ferramenta viável com potencial uso diagnóstico na recuperação de espécies de enteroparasitos humanos, dentre helmintos e protozoários do trato digestório. Com isso, é necessária a ampliação e especialização desta nova aplicação para a detecção de parasitos humanos em uma perspectiva prática laboratorial.

## 6. CONCLUSÃO

Neste estudo concluímos que o sistema operacional de FAD desenvolvido é promissor na aplicação prática laboratorial em vista do diagnóstico das espécies de parasitos intestinais mais prevalentes na população. A viabilidade do princípio técnico de FAD na recuperação/concentração de parasitos intestinais de humanos foi comprovada por meio dos registros de imagens da interação entre parasitos e microbolhas. O uso de reagente surfactante catiônico (CTAB 10%) na formação das microbolhas aprimora a recuperação de parasitos no conteúdo flotado. O sistema operacional e primeiro protocolo técnico de FAD foi validado neste estudo intralaboratorial ao apresentar eficiência diagnóstica com 91.38% de sensibilidade e concordância Substancial (0.64) em relação ao resultado Padrão Ouro. Os dados apresentados nesta tese suscitam a necessidade do aprimoramento deste princípio técnico inédito na Medicina Laboratorial em um estudo de campo com a perspectiva de mecanização da FAD e integração ao diagnóstico automatizado por imagens.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. World Health Organization | Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases [Internet]. WHO. 2013 [citado 2 de agosto de 2021]. Disponível em: [https://www.who.int/iris/bitstream/10665/77950/1/9789241564540\\_eng.pdf?ua=1](https://www.who.int/iris/bitstream/10665/77950/1/9789241564540_eng.pdf?ua=1)
2. Garcia LS. Clinical Microbiology Procedures Handbook. American Society for Microbiology Press; 2010. 2265 p.
3. Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
4. Alum A, Rubino JR, Ijaz MK. The global war against intestinal parasites—should we use a holistic approach? *Int J Infect Dis*. 2010;14(9):e732–8.
5. Savioli L, Smith H, Thompson A. Giardia and Cryptosporidium join the ‘Neglected Diseases Initiative’. *Trends Parasitol*. 2006;22(5):203–8.
6. Lin A, Ercumen A, Benjamin-Chung J, Arnold BF, Das S, Haque R, et al. Effects of Water, Sanitation, Handwashing, and Nutritional Interventions on Child Enteric Protozoan Infections in Rural Bangladesh: A Cluster-Randomized Controlled Trial. *Clin Infect Dis*. 2018;67(10):1515–22.
7. Utzinger J, Becker SL, Knopp S, Blum J, Neumayr AL, Keiser J, et al. Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. *Swiss Med Wkly*. 2012;22:142.
8. Carvalho JB de, Santos BM dos, Gomes JF, Suzuki CTN, Hoshino Shimizu S, Falcão AX, et al. TF-Test Modified: New Diagnostic Tool for Human Enteroparasitosis. *J Clin Lab Anal*. 2016;30(4):293–300.
9. Gomes JF, Hoshino-Shimizu S, S. Dias LC, Araujo AJSA, Castilho VLP, Neves FAMA. Evaluation of a novel kit (TF-Test) for the diagnosis of intestinal parasitic infections. *J Clin Lab Anal*. 2004;18(2):132–8.
10. Bergquist R, Johansen MV, Utzinger J. Diagnostic dilemmas in helminthology: what tools to use and when? *Trends Parasitol*. 2009;25(4):151–6.
11. Santos FLN, Gonçalves M de S, Soares NM. Validation and utilization of PCR for differential diagnosis and prevalence determination of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* in Salvador City, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2011;15(2):119–25.
12. Llewellyn S, Inpankaew T, Nery SV, Gray DJ, Verweij JJ, Clements ACA, et al. Application of a Multiplex Quantitative PCR to Assess Prevalence and Intensity Of Intestinal Parasite Infections in a Controlled Clinical Trial. *PLOS Negl Trop Dis*. 2016;10(1):e0004380.
13. Uecker M, Copetti CE, Poleze L, Flores V. Infecções parasitárias: diagnóstico imunológico de enteroparasitoses. *Rev Bras Anal Clin*. 2007;39(1):15–9.

14. ElBakri A, Samie A, Ezzedine S, Odeh R. Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* in fecal samples by nested PCR in the United Arab Emirates (UAE). *Acta Parasitol.* 2013;58(2):185–90.
15. Soares FA, Benitez A do N, Santos BM dos, Loiola SHN, Rosa SL, Nagata WB, et al. A historical review of the techniques of recovery of parasites for their detection in human stools. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020;53:e20190535.
16. Gonçalves AQ, Abellana R, Pereira-da-Silva HD, Santos I, Serra PT, Julião GR, et al. Comparison of the performance of two spontaneous sedimentation techniques for the diagnosis of human intestinal parasites in the absence of a gold standard. *Acta Trop.* 2014;131(Supplement C):63–70.
17. Van Lieshout L, Roestenberg M. Clinical consequences of new diagnostic tools for intestinal parasites. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(6):520–8.
18. Hawkins KR, Cantera JL, Storey HL, Leader BT, Santos T de los. Diagnostic Tests to Support Late-Stage Control Programs for Schistosomiasis and Soil-Transmitted Helminthiasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(12):e0004985.
19. Garcia LS, Arrowood M, Kokoskin E, Paltridge GP, Pillai DR, Procop GW, et al. Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(1):e00025-17.
20. Manser MM, Saez ACS, Chiodini PL. Faecal Parasitology: Concentration Methodology Needs to be Better Standardised. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(4):e0004579.
21. Lutz A. O *Schistosomum mansoni* e a Schistosomatose segundo observações, feitas no Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1919;11(1):121–55.
22. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. *J Public Health.* 1934;9:281–98.
23. Willis HH. A Simple Levitation Method for the Detection of Hookworm Ova. *Medical Journal of Australia* [Internet]. 1921 [citado 23 de novembro de 2017];2(18). Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19222900461>
24. Sheather AL. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. *J Comp Pathol.* 1923;36(Supplement C):266–75.
25. Faust EC, Sawitz W, Tobie J, Odom V, Peres C, Lincicome DR. Comparative Efficiency of Various Technics for the Diagnosis of Protozoa and Helminths in Feces. *J Parasitol.* 1939;25(3):241–62.
26. Cringoli G. FLOTAC, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique. *Parassitologia.* 2006;48(3):381–4.
27. Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. *Bulletin of the United States Army Medical Department* [Internet]. 1948 [citado 23 de novembro de 2017];8(4). Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19480801031>

28. Allen AV, Ridley DS. Further observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites. *J Clin Pathol.* 1970;23(6):545–6.
29. Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol.* dezembro de 1979;10(6):852–3.
30. Baermann G. Eine einfache methode zur auffindung von Ankylostomum. Vol. 41. 1917.
31. Moraes RG. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrongiloidíase no Brasil. *Rev Serv Saúde Pública.* 1948;1:507–24.
32. Rugai E, Mattos T, Brisola AP. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes - Modificação do Método de Baermann. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 1954;14(1):5–8.
33. Becker A-C, Kraemer A, Epe C, Strube C. Sensitivity and efficiency of selected coproscopical methods—sedimentation, combined zinc sulfate sedimentation-flotation, and McMaster method. *Parasitol Res.* 2016;115(7):2581–7.
34. Collender PA, Kirby AE, Addiss DG, Freeman MC, Remais JV. Methods for quantification of Soil-Transmitted Helminths in environmental media: Current techniques and recent advances. *Trends Parasitol.* 2015;31(12):625–39.
35. Rosa SL, Dos Santos BM, Soares FA, Loiola SHN, Inácio SV, Suzuki CTN, et al. Use of the Aqueous Biphasic System as an Alternative for Concentration of *Ascaris lumbricoides* Eggs, with Non-toxic Separation of Fecal Residues and Fats. *Trop Med Int Health.* 2019;
36. Carvalho GLX de, Moreira LE, Pena JL, Marinho CC, Bahia MT, Machado-Coelho GLL. 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.* 2012;107(1):80–4.
37. Coelho WMD, Gomes JF, Falcão AX, Santos BM dos, Soares FA, Suzuki CTN, et al. Comparative study of five techniques for the diagnosis of canine gastrointestinal parasites. *Rev Bras de Parasitol Vet.* 2015;24(2):223–6.
38. Glinz D, Silué KD, Knopp S, Lohourignon LK, Yao KP, Steinmann P, et al. Comparing Diagnostic Accuracy of Kato-Katz, Koga Agar Plate, Ether-Concentration, and FLOTAC for *Schistosoma mansoni* and Soil-Transmitted Helminths. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(7):e754.
39. Gomes LI, Enk MJ, Rabello A, Gomes LI, Enk MJ, Rabello A. Diagnosing schistosomiasis: where are we? *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(1):3–11.
40. Wolfe MS. Giardiasis. *Clin Microbiol Rev.* 1º de janeiro de 1992;5(1):93–100.
41. Rebolla MF, Silva EM, Gomes JF, Falcão AX, Rebolla MVF, Franco RMB, et al. High prevalence of *Blastocystis* spp. infection in children and staff members attending public urban schools in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2016;58.

42. Jiménez B, Maya C, Velásquez G, Torner F, Arambula F, Barrios JA, et al. Identification and quantification of pathogenic helminth eggs using a digital image system. *Exp Parasitol*. 2016;166(Supplement C):164–72.
43. Suzuki CTN, Gomes JF, Falcao AX, Papa JP, Hoshino-Shimizu S. Automatic Segmentation and Classification of Human Intestinal Parasites From Microscopy Images. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2013;60(3):803–12.
44. Osaku D, Cuba CF, Suzuki CTN, Gomes JF, Falcão AX. Automated diagnosis of intestinal parasites: A new hybrid approach and its benefits. *Comput Biol Med*. 2020;123:103917.
45. Laboratory of Image Data Science. Research: Automated Diagnosis of Gastrintestinal Parasites [Internet]. Laboratory of Image Data Science (LIDS). [citado 2 de agosto de 2021]. Disponível em: <https://lids.ic.unicamp.br/researches/3>
46. Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet*. 2006;367(9521):1521–32.
47. Brum JWA, Conceição A da S, Gonçalves FV da C, Maximiano LHS, Diniz LBMPV, Pereira MN, et al. Parasitoses oportunistas em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*. 2013;11(3):280–8.
48. Osman M, Safadi DE, Cian A, Benamrouz S, Nourrisson C, Poirier P, et al. Prevalence and Risk Factors for Intestinal Protozoan Infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among Schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLOS Negl Trop Dis*. 2016;10(3):e0004496.
49. Melo EM, Ferraz FN, Aleixo DL. Importance of study about prevalence of enteroparasitoses in school-age children. *SaBios: Rev Saúde e Biol*. 2010;5(1):43–7.
50. WHO. Water sanitation and hygiene for accelerating and sustaining progress on neglected tropical diseases [Internet]. WHO. 2015 [citado 2 de agosto de 2021]. Disponível em: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/182735/WHO\\_FWC\\_WSH\\_15.12\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/182735/WHO_FWC_WSH_15.12_eng.pdf)
51. Sergio JV, Leon ACP de. Analysis of mortality from diarrheic diseases in under-five children in Brazilian cities with more than 150,000 inhabitants. *Cad Saude Publica*. 2009;25(5):1093–102.
52. Hotez PJ. Pediatric geohelminth infections: Trichuriasis, ascariasis, and hookworm infections. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2000;11(4):236–44.
53. Halliez MC, Buret AG. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World J Gastroenterol*. 2013;19(47):8974–85.
54. WHO. World Health Organization | Helminth control in school age children: a guide for managers of control programmes [Internet]. 2011 [citado 2 de agosto de 2021]. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44671/1/9789241548267\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44671/1/9789241548267_eng.pdf?ua=1)
55. Tinkler SH. Preventive chemotherapy and anthelmintic resistance of soil-transmitted helminths – Can we learn nothing from veterinary medicine? *One Health*. 2020;9:100106.

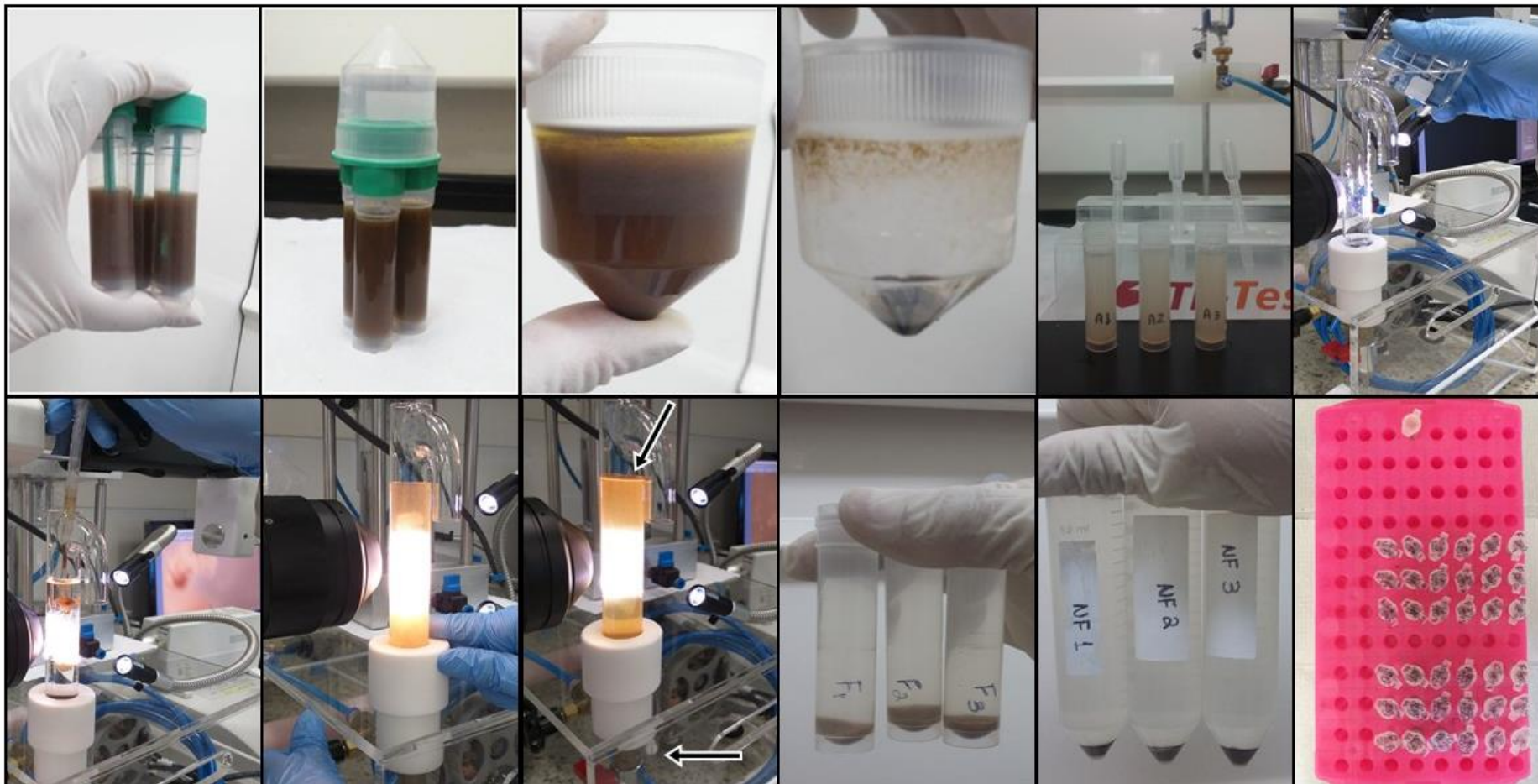
56. Hodgkinson JE, Kaplan RM, Kenyon F, Morgan ER, Park AW, Paterson S, et al. Refugia and anthelmintic resistance: Concepts and challenges. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2019;10:51–7.
57. Féris LA, Gallina SCW, Rodrigues RT, Rubio J. Optimizing dissolved air flotation design system. *Braz J Chem Eng*. 2000;17(4–7):549–56.
58. Edzwald JK. Dissolved air flotation and me. *Water Res*. 2010;44(7):2077–106.
59. Luz AB da, Sampaio JA, França SCA. *Tratamento de Minérios*. 5º ed. Rio de Janeiro: CETEM/MCT; 2010.
60. Karhu M, Leiviskä T, Tanskanen J. Enhanced DAF in breaking up oil-in-water emulsions. *Sep Purif Technol*. 2014;122:231–41.
61. Amaral Filho J, Azevedo A, Etchepare R, Rubio J. Removal of sulfate ions by dissolved air flotation (DAF) following precipitation and flocculation. *Int J Miner Process*. 2016;149:1–8.
62. Reali APM, Penetra RG, Carvalho ME de. Flotation technique with coagulant and polymer application applied to the post-treatment of effluents from anaerobic reactor treating sewage. *Water Science and Technology*. 2001;44(4):205–12.
63. Rubio J, Souza ML, Smith RW. Overview of flotation as a wastewater treatment technique. *Miner Eng*. 2002;15(3):139–55.
64. Pioltine A, Reali MAP. Influência do tamanho de flocos e da concentração de ar dissolvido na eficiência da flotação. *Eng Sanit e Ambient*. 2015;20(3):513–23.
65. Oliveira C, Rubio J. Zeta potential of single and polymer-coated microbubbles using an adapted microelectrophoresis technique. *Int J Miner Process*. 2011;98(1):118–23.
66. Yap RKL, Whittaker M, Diao M, Stuetz RM, Jefferson B, Bulmus V, et al. Hydrophobically-associating cationic polymers as micro-bubble surface modifiers in dissolved air flotation for cyanobacteria cell separation. *Water Res*. 2014;61:253–62.
67. Jefferson B, Sharp EL, Goslan E, Henderson R, Parsons SA. Application of charge measurement to water treatment processes. *Water Sci Technol*. 2004;4(5–6):49–56.
68. Henderson RK, Parsons SA, Jefferson B. Successful Removal of Algae through the Control of Zeta Potential. *Sep Sci Technol*. 2008;43(7):1653–66.
69. Henderson RK, Parsons SA, Jefferson B. The Potential for Using Bubble Modification Chemicals in Dissolved Air Flotation for Algae Removal. *Sep Sci Technol*. 2009;44(9):1923–40.
70. Plummer JD, Edzwald JK, Kelley MB. Removing Cryptosporidium by Dissolved-Air Flotation. *J Am Water Works Assoc*. 1995;87(9):85–95.
71. Edzwald JK, Tobiason JE, Parento LM, Kelley MB, Kaminski GS, Dunn HJ, et al. Giardia and Cryptosporidium Removals by clarification and filtration under challenge conditions. *Journal - AWWA*. 2000;92(12):70–84.

72. Cheng Y-L, Juang Y-C, Liao G-Y, Ho S-H, Yeh K-L, Chen C-Y, et al. Dispersed ozone flotation of *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol*. 2010;101(23):9092–6.
73. Hanumanth Rao NR, Yap R, Whittaker M, Stuetz RM, Jefferson B, Peirson WL, et al. The role of algal organic matter in the separation of algae and cyanobacteria using the novel “Posi” - Dissolved air flotation process. *Water Res*. 2018;130:20–30.
74. Singh V, Tyagi R. Investigations of mixed surfactant systems of lauryl alcohol-based bisulfosuccinate anionic gemini surfactants with conventional surfactants: A fluorometric study. *Journal of Taibah University for Science*. 2015;9(4):477–89.
75. Fleiss JL, FLEISS JLA, Fleiss JL. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. Wiley; 1981. 358 p.
76. Maclure M, Willett WC. Misinterpretation and misuse of the Kappa statistic. *Am J Epidemiol*. 1987;126(2):161–9.
77. Galen RS, Gambino SR. *Beyond Normality: The Predictive Value and Efficiency of Medical Diagnoses*. John Wiley & Sons; 1975. 252 p.
78. Rothman KJ, Boice HD, Austin H. *Epidemiologic Analysis with a Programmable Calculator*. 2nd ed. Boston, USA: Epidemiology Resources, Incorporated; 1982.
79. Feinstein AR. *Clinical Epidemiology: The Architecture of Clinical Research*. Philadelphia - USA: W.B. Saunders Company; 1985. 840 p.
80. Barda BD, Rinaldi L, Ianniello D, Zepherine H, Salvo F, Sadutshang T, et al. Mini-FLOTAC, an Innovative Direct Diagnostic Technique for Intestinal Parasitic Infections: Experience from the Field. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(8):e2344.
81. Barbosa A da S, Bastos OMP, Uchôa CMA, Pissinatti A, Bastos ACMP, Souza IV de, et al. Comparison of five parasitological techniques for laboratory diagnosis of *Balantidium coli* cysts. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2016;25(3):286–92.
82. Rodrigues RT, Rubio J. New basis for measuring the size distribution of bubbles. *Miner Eng*. 2003;16(8):757–65.
83. Oliveira C, Rodrigues RT, Rubio J. A new technique for characterizing aerated flocs in a flocculation–microbubble flotation system. *Int J Miner Process*. 2010;96(1):36–44.
84. Zhang M, Guiraud P. Surface-modified microbubbles (colloidal gas aphrons) for nanoparticle removal in a continuous bubble generation-flotation separation system. *Water Research*. 2017;126:399–410.
85. Kwak D-H, Kim M-S. Flotation of algae for water reuse and biomass production: role of zeta potential and surfactant to separate algal particles. *Water Sci Technol*. 2015;72(5):762–9.
86. Kochanowski M, Karamon J, Dąbrowska J, Cencek T. Experimental Estimation of the Efficacy of the Flotac Basic Technique. *J Parasitol*. 2014;100(5):633–9.

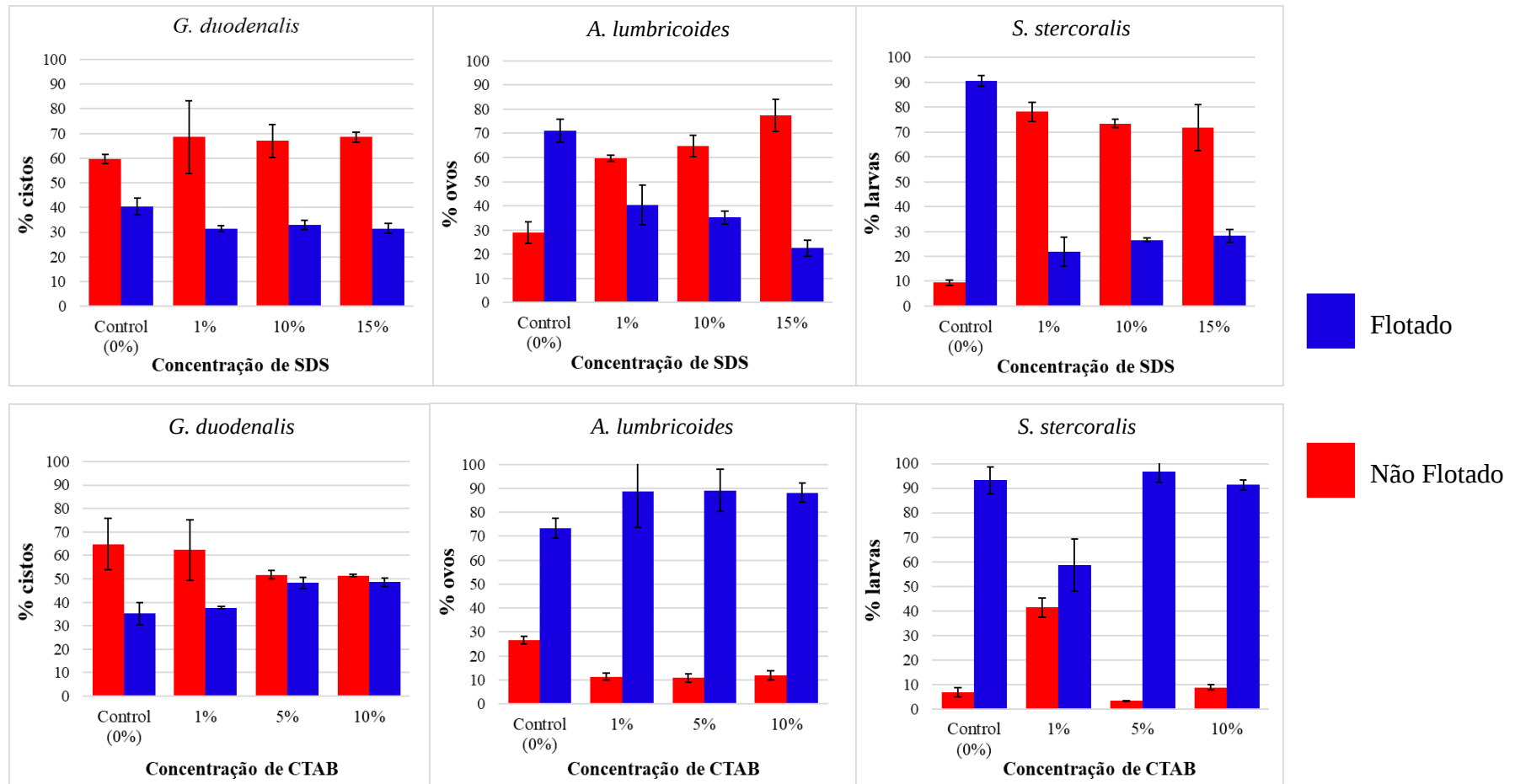
87. Capizzi S, Schwartzbrod J. Surface properties of *Ascaris suum* eggs: hydrophobic potential and Lewis acid-base interactions. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2001;22(2):99–105.
88. Drozd C, Schwartzbrod J. Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62(4):1227–32.
89. Hsu B-M, Huang C. Influence of ionic strength and pH on hydrophobicity and zeta potential of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2002;201(1):201–6.
90. Potocar T, Leite L de S, Daniel LA, Pivokonsky M, Matoulkova D, Branyik T. Cooking oil-surfactant emulsion in water for harvesting *Chlorella vulgaris* by sedimentation or flotation. *Bioresource Technology*. 2020;311:123508.
91. LIU JC, CHEN YM, JU Y-H. Separation of Algal Cells from Water by Column flotation. *Sep Sci Technol*. 1999;34(11):2259–72.
92. Faustino LM, Braga AS, Sacchi GD, Whitaker W, Reali MAP, Filho LSL, et al. Removal of iron ore slimes from a highly turbid water by DAF. *Environ Technol*. 2019;40(26):3444–55.
93. Terasaka K, Hirabayashi A, Nishino T, Fujioka S, Kobayashi D. Development of microbubble aerator for waste water treatment using aerobic activated sludge. *Chemical Engineering Science*. 2011;66(14):3172–9.
94. Leppinen DM, Dalziel SB. Bubble size distribution in dissolved air flotation tanks. *J Water Supply: Res Technol*. 2004;53(8):531–43.
95. Moruzzi RB, Reali M a. P. Characterization of micro-bubble size distribution and flow configuration in DAF contact zone by a non-intrusive image analysis system and tracer tests. *Water Sci Technol*. 2010;61(1):253–62.
96. Azevedo A, Etchepare R, Rubio J. Raw water clarification by flotation with microbubbles and nanobubbles generated with a multiphase pump. *Water Sci Technol*. 2017;75(10):2342–9.
97. Zhang W-H, Zhang J, Zhao B, Zhu P. Microbubble Size Distribution Measurement in a DAF System. *Ind Eng Chem Res*. 2015;54(18):5179–83.
98. Rodrigues RT, Rubio J. DAF–dissolved air flotation: Potential applications in the mining and mineral processing industry. *Int J Miner Process*. 2007;82(1):1–13.
99. Moruzzi RB, Reali M a. P. The influence of floc size and hydraulic detention time on the performance of a dissolved air flotation (DAF) pilot unit in the light of a mathematical model. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2014;37(12):2445–52.
100. Santos BM, Soares FA, Rosa SL, Gomes D da CF, Oliveira BCM, Peixinho AZ, et al. TF-Test Quantified: a new technique for diagnosis of *Schistosoma mansoni* eggs. *Trop Med Int Health*. 2019;24(5):586–95.
101. Teixeira CF, Neuhauss E, Ben R, Romanzini J, Graeff-Teixeira C. Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. *PLoS Negl Trop Dis*. 2007;1(2):e73.

102. Utzinger J, Botero-Kleiven S, Castelli F, Chiodini PL, Edwards H, Köhler N, et al. Microscopic diagnosis of sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed stool samples for helminths and intestinal protozoa: a comparison among European reference laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(3):267–73.
103. Amoah ID, Singh G, Stenström TA, Reddy P. Detection and quantification of soil-transmitted helminths in environmental samples: A review of current state-of-the-art and future perspectives. *Acta Trop.* 2017;169:187–201.
104. Dogantekin E, Yilmaz M, Dogantekin A, Avci E, Sengur A. A robust technique based on invariant moments – ANFIS for recognition of human parasite eggs in microscopic images. *Expert Syst Appl.* 2008;35(3):728–38.

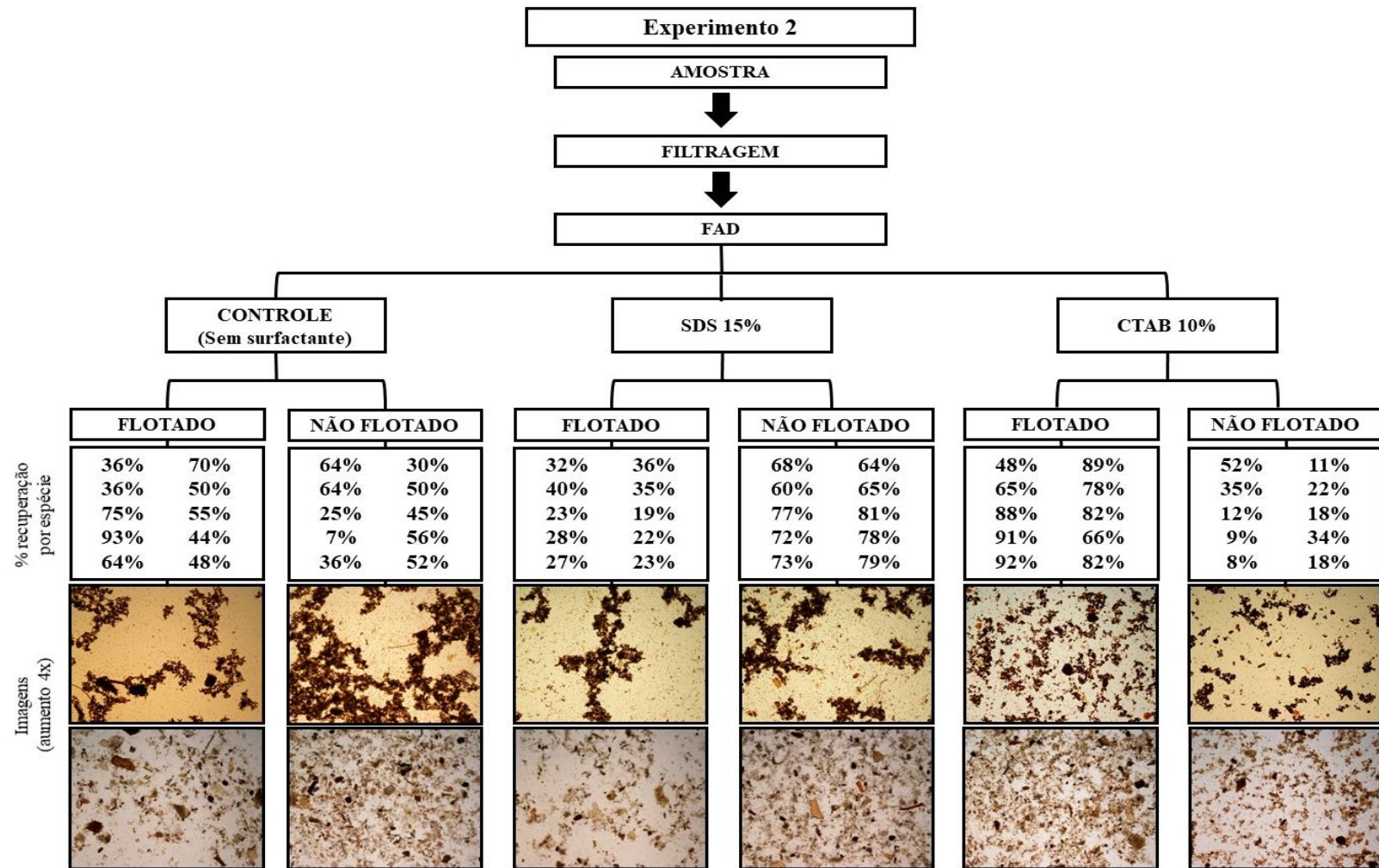
## 8. APÊNDICE



**Apêndice 1** – Etapas de processamento de amostras fecais pelo sistema de FAD e separação de regiões flotada e não flotada (setas) para avaliação de recuperação de parasitos intestinais.



**Apêndice 2** – Gráficos de resultados do Experimento 1 - Recuperação de cistos, ovos e larvas das espécies *G. duodenalis*, *A. lumbricoides* e *S. stercoralis*, respectivamente, em função das concentrações dos surfactantes SDS e CTAB.



**Apêndice 3** – Fluxograma de resultados do Experimento 2 - Percentual de recuperação de oito espécies de parasitos intestinais e campo visual de imagens de microscopia de amostra obtida pelo processamento FAD (Controle, SDS 15% e CTAB 10%) em regiões flotadas e não flotadas.

## 9. ANEXOS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                      |                                                                                                                     |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--|--|------------------------------|--|------------------------|---------------|----------------------------|--|--------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| <br><b>CEPUNICAMP</b><br><small>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</small>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <b>UNICAMP - CAMPUS<br/>CAMPINAS</b> | <br><b>Plataforma<br/>Brasil</b> |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |
| PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                      |                                                                                                                     |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |
| <b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                      |                                                                                                                     |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |
| <b>Título da Pesquisa:</b> DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO LABORATORIAL DE UMA NOVA TÉCNICA DE DETECÇÃO DE PARASITOS INTESTINAIS UTILIZANDO DO PRINCÍPIO DE FLOTAÇÃO POR AR DISSOLVIDO                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                      |                                                                                                                     |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |
| <b>Pesquisador:</b> Jancarlo Ferreira Gomes                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                      |                                                                                                                     |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |
| <b>Área Temática:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                      |                                                                                                                     |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |
| <b>Versão:</b> 3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                      |                                                                                                                     |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |
| <b>CAAE:</b> 79823117.7.0000.5404                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                      |                                                                                                                     |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |
| <b>Instituição Proponente:</b> Instituto de Computação                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                      |                                                                                                                     |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |
| <b>Patrocinador Principal:</b> Financiamento Próprio                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                      |                                                                                                                     |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |
| <b>DADOS DO PARECER</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                      |                                                                                                                     |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |
| <b>Número do Parecer:</b> 2.467.727                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                      |                                                                                                                     |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |
| <b>Apresentação do Projeto:</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                      |                                                                                                                     |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |
| <b>Apresentação do projeto</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                      |                                                                                                                     |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |
| <p>1.1 Parasitoses Intestinais e dificuldades diagnósticas No mundo cerca de 3.5 bilhões de pessoas são acometidas por alguma parasitose Intestinal (sinonímia: enteroparasitose), sobretudo em regiões de climas tropical, subtropical e equatorial em países em desenvolvimento, bem como no Brasil (WHO, 2013<sup>a</sup>). Os agentes etiológicos relacionados às enteroparasitoses são aqueles que em alguma fase do seu ciclo evolutivo utilizam o trato digestório do hospedeiro vertebrado (ser humano, p.ex.) como habitat (GOMES et al., 2004; GARCIA, 2009). As infecções parasitárias têm grande importância na etiologia da anemia, abscesso e obstrução Intestinal, desnutrição, diarreia crônica, perda de peso e sinais imunopatológicos, que podem agravar o quadro clínico de um indivíduo (REY, 2013). Com isso, fica evidente a necessidade de dar atenção a essas doenças que em muitas vezes são despercebidas, ou negligenciadas, pelos órgãos de saúde e acometem uma parcela expressiva da população mundial (REBOLLA et al., 2016). A literatura relata que a forma mais apropriada para diagnosticar a presença de parasitos do trato Intestinal de humanos é por meio do exame parasitológico de fezes, mediante o emprego de técnicas convencionais e kits comerciais, especialmente por ser de simples execução, baixo custo e de evidência direta (GOMES et al., 2004; CARVALHO et al, 2012; CARVALHO et al., 2015; COELHO et al., 2015; REBOLLA et al., 2016). Porém, independentemente de ser de grande uso em laboratórios de análises clínicas, as</p> |                                      |                                                                                                                     |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |
| <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2"><b>Endereço:</b> Rua Tessália Vieira de Camargo, 126</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Bairro:</b> Barão Geraldo</td> <td></td> <td><b>CEP:</b> 13.083-887</td> </tr> <tr> <td><b>UF:</b> SP</td> <td><b>Município:</b> CAMPINAS</td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>Telefone:</b> (19)3521-8938</td> <td><b>Fax:</b> (19)3521-7187</td> <td><b>E-mail:</b> cep@fcm.unicamp.br</td> </tr> </table>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                      |                                                                                                                     | <b>Endereço:</b> Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 |  |  | <b>Bairro:</b> Barão Geraldo |  | <b>CEP:</b> 13.083-887 | <b>UF:</b> SP | <b>Município:</b> CAMPINAS |  | <b>Telefone:</b> (19)3521-8938 | <b>Fax:</b> (19)3521-7187 | <b>E-mail:</b> cep@fcm.unicamp.br |
| <b>Endereço:</b> Rua Tessália Vieira de Camargo, 126                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                      |                                                                                                                     |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |
| <b>Bairro:</b> Barão Geraldo                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                      | <b>CEP:</b> 13.083-887                                                                                              |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |
| <b>UF:</b> SP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <b>Município:</b> CAMPINAS           |                                                                                                                     |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |
| <b>Telefone:</b> (19)3521-8938                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>Fax:</b> (19)3521-7187            | <b>E-mail:</b> cep@fcm.unicamp.br                                                                                   |                                                      |  |  |                              |  |                        |               |                            |  |                                |                           |                                   |



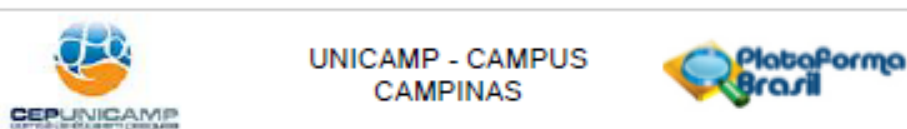
Continuação do Parecer 2.467.727

técnicas parasitológicas convencionais e/ou kits comerciais deixam a desejar nesta modalidade de exame, especialmente por mostrarem baixas e moderadas sensibilidades diagnósticas (CARVALHO et al., 2012; CARVALHO et al., 2015; COELHO et al., 2015). Diversos problemas apresentados pelas técnicas convencionais são relatados na literatura, no que se refere às limitações de ordem técnica e biológica, tais como: a) O material processado possui excessiva quantidade de impurezas fecais na preparação da lâmina de microscopia pela técnica de Lutz (1919) e/ou Hoffman, Pons e Janer (1934), desta forma podendo encobrir algumas estruturas parasitárias, ou até mesmo os artefatos fecais (pseudoparasitos ou pseudosimbiontes, p.ex.) serem confundidos com parasitos; b) As técnicas praticadas por princípio de flutuação, por exemplo Willis (1921) e Faust et al., (1939), se limitam ao diagnóstico de oocistos e cistos de protozoários e larvas e ovos leves de helmintos, sendo inapropriadas para a detecção de ovos de trematódeos, cestóides ou inférteis de *Ascaris lumbricoides*; c) Além disso, as técnicas de flutuação por densidade específica utilizam de soluções saturadas de reagentes que favorecem a lise celular ou desfiguração da morfologia do parasito (Fig. 1), principalmente protozoários, que ocasiona no erro diagnóstico; e d) As técnicas de Baermann-Morales (1917) e Rugai, Mattos e Brisola (1954) concentram apenas larvas de nematóides e a técnica de Kato-Katz se restringe ao diagnóstico quantitativo de cerca de cinco espécies de helmintos (GLINZ et al., 2010; BECKER et al., 2011; GOMES et al., 2013). Ao longo dos últimos anos, várias alterações procedimentais para o aprimoramento das técnicas convencionais e kits comerciais foram desenvolvidos para aumentar a sensibilidade desse diagnóstico, porém, este exame ainda deixa a desejar em eficiência (CARVALHO et al., 2015; MANSER, SAEZ & CHIODINI, 2016). Para o desenvolvimento e validação de novos procedimentos técnicos com enriquecimento parasitário, eliminação de impurezas e manutenção da integridade parasitária é necessária a inovação tecnológica para a melhoria da sensibilidade diagnóstica no exame parasitológico das fezes.

### 1.2 A Flotação por Ar Dissolvido e suas perspectivas

A Flotação por Ar Dissolvido (FAD) é um procedimento técnico desenvolvido a partir de um princípio de separação misturas de forma seletiva (tratamento de minérios, por exemplo) ou separação de sólidos suspensos em meio líquido (REALI, 1991). Este processo de separação ocorre devido à despressurização de água saturada de ar ( $>1\text{atm}$ ) em um meio líquido à pressão atmosférica ( $1\text{atm}$ ), que ocasiona na formação de microbolhas. Estas microbolhas, por sua vez, em contato e adesão com uma partícula formam um agregado (partícula-microbolha) de densidade menor que a da suspensão, submetido a uma força de empuxo que promove sua flotação em sentido ascendente para a camada sobrenadante do meio para uma posterior separação mecânica (EDZWALD et al., 2010). O Sistema de FAD normalmente consiste de um compressor de ar que fornece ar pressurizado para uma

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
 UF: SP Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.467.727

câmara de saturação conectada a uma coluna de flotação (Fig. 2). Atualmente este princípio técnico é objeto de estudos em diversas áreas de aplicação, tais como: tratamento de efluentes de indústria têxtil, tratamento de despejos líquidos industriais provenientes de laticínios, tratamento de fibras geradas no processo produtivo industrial de papel, tratamento de derivados da área petroquímica, recuperação de íons precipitados, e recuperação de algas (KARHU et al., 2014). No setor ambiental, reagentes são utilizados para reforçar a interação eletroquímica entre partículas formando flocos de alta carga iônica e neutralizando as forças repulsivas. A ação de aditivos coesores (Fig. 3) além de estabilizar as também proporciona a tensão superficial das bolhas no qual favorece uma adesão mais estável e flotação do agregado formado (RUBIO, SOUZA e SMITH, 2002; HENDERSON, PARSONS E JEFFERSON, 2008). Além disso, as condições hidrodinâmicas quanto à pressão fornecida no sistema, a distribuição do tamanho das microbolhas, a configuração da zona de contato (coluna de flotação), volume de recirculação e o tempo de coleta podem influenciar significativamente na eficiência de flotação (PIOLTINE e REALI, 2015). Em estudos prévios com o intuito de purificar a água em estações de tratamento (Estação de Tratamento de Água – ETA), foi observado a remoção de cistos de *Giardia duodenalis* e oocistos de *Cryptosporidium* spp. Pela FAD, apresentando ser mais eficiente do que o procedimento laboratorial de sedimentação-espontânea usado no setor ambiental (EDZWALD et al., 2000; CHENG et al., 2010). O autor desta proposta, em estudo anterior de dissertação de mestrado, proporcionou de maneira inédita a viabilização laboratorial do princípio de FAD (SOARES, 2016; GOMES et al., 2016) para a recuperação de ovos do helminto *Hymenolepis diminuta* (Fig 4), evidenciando as vantagens deste procedimento técnico em relação às técnicas convencionais de concentração parasitária para fins diagnósticos. Para isto, em um dispositivo apropriado contendo suspensão fecal, o procedimento técnico proposto gerou bolhas que são propensas em aderir (por reação eletroquímica) nas membranas externas de parasitos, arrastando-os à superfície deste dispositivo por empuxo, com o intuito de reduzir as impurezas fecais. O presente trabalho, com o emprego da FAD propõe a elaboração de uma inédita técnica que atenda aos objetivos principais do exame parasitológico das fezes de humanos, com maior eficiência e abrangência diagnóstica, sem que haja algum prejuízo, ou dano, às diversas morfologias das estruturas parasitárias. A FAD aplicada no setor ambiental para o tratamento de águas demonstrou maior eficiência na recuperação de cistos de *G. duodenalis* e oocistos de *Cryptosporidium* spp. Em comparação com a sedimentação espontânea, de modo a ser uma promissora técnica para o uso diagnóstico de rotina. Além disso, com o uso de surfactantes ou polímeros de baixa densidade específica, ocorre um aumento de recuperação e seletividade no processo de flotação. Existem poucos estudos sobre os efeitos de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-867  
 UF: SP Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS  
CAMPINAS

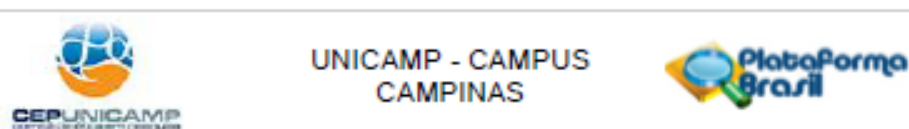


Continuação do Parecer: 2.457.727

carga superficial (potencial zeta) de parasitos intestinais no processo de FAD com a utilização das espécies mais prevalentes na população. Esta proposta de trabalho faz parte de um projeto mais amplo, que visará fornecer subsídios e novos achados para estudos com enfoque em diagnóstico de parasitos intestinais em humanos e animais.

Hipótese: A partir de revisão bibliográfica, os dados sobre a carga superficial das formas parasitárias permitirão a escolha de reagentes químicos, surfactantes ou polímeros, que possibilitem a neutralização de cargas de repulsão entre microbolhas de carga negativa e espécies parasitárias provavelmente também negativas. O registro de Imagem por microfotografia, permitirá a confirmação inédita da nossa hipótese (H1) de adesão entre as microbolhas geradas pelo dispositivo de FAD e as diversas espécies alvos deste estudo, bem como demonstrado preliminarmente para com ovos da espécie *H. diminuta* obtidos em fezes de ratos de experimentação (SOARES, 2016). Com os ensaios de FAD contendo amostras positivas de parasitos, procuramos obter o número médio de estruturas parasitárias (ovos – larvas – cistos) por lâmina de microscopia e comparar, por meio do teste t de Student ( $p < 0,05$ ), com o número recuperado por técnica convencional. Com os parâmetros de flotação ótimos definidos para recuperação de parasitos intestinais, busca-se a padronização de uma primeira versão de protocolo operacional para o processamento de amostras que culmina no diagnóstico. Esta técnica de FAD será validada com a confirmação de parâmetros de reprodutibilidade com base na positividade desta técnica com a técnica convencional de TF-Test. Ademais, estes resultados apresentarão a classificação de sensibilidade, especificidade e concordância paramétrica Kappa ( $k$ ) obtida pela técnica de FAD em relação à técnica tradicional em rotina laboratorial. Metodologia Proposta: 6.1 Local de realização da pesquisa. Este trabalho será executado e receberá os apoios irrestritos do LIDS e do Laboratório de Físico-Química do Instituto de Química, ambos da UNICAMP, tendo todo apoio estrutural, técnico e científico que beneficie todas as etapas da pesquisa. A pesquisa se realizará por meio da concessão de amostras fecais positivas para helmintos e protozoários intestinais diversos, conferido pelo Laboratório Municipal de Análises Clínicas do município de Campinas – SP (Instituição coparticipante) e o pesquisador do projeto em questão. 6.2 População a ser estudada pesquisa requer uso de material biológico excretado (fezes) por humanos. Após a realização das análises de rotina laboratorial, uma parte das amostras biológicas cedidas ao sistema público de saúde, seriam descartados como resíduos sólidos. A proposta desta pesquisa é fazer uso destas amostras. Estima-se a avaliação de um total de 200 amostras positivas, oriundas de pacientes da rede municipal de saúde. Em vista do exposto, esclareço que os colaboradores deste projeto de pesquisa não terão nenhum tipo de gasto com

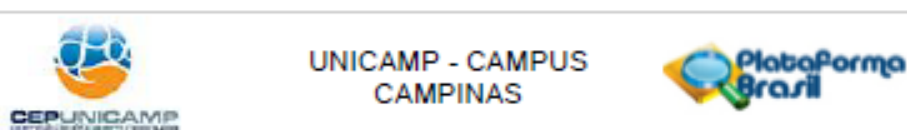
Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-867  
UF: SP Município: CAMPINAS  
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.467.727

transporte e aquisição de frascos coletores. 6.3 Coleta de amostras Os pacientes atendidos nas referenciadas UBS's com solicitação de exame parasitológico de fezes, serão convidados pela equipe de atendimento a participar do atual projeto de pesquisa. Nessa ocasião, serão feitos todos os esclarecimentos sobre os objetivos da pesquisa, bem como: riscos e benefícios envolvidos; procedimentos a serem solicitados aos participantes; e, garantia de privacidade e sigilo aos envolvidos. Caso aceitem colaborar com a pesquisa, cada voluntário receberá o documento TCLE, em duas vias, para a devida assinatura de consentimento. Os participantes serão orientados a colher amostras fecais com o emprego de potes coletores convencionais para o processamento laboratorial usual do exame no LMC, como também nos três frascos coletores TF-Test, os quais contêm líquido preservador a base de solução neutra de formalina para o processamento da técnica de TF-Test Conventional. 6.4 Unidade prototípica FAD para avaliações de recuperação parasitária Unidade prototípica FAD possui os seguintes componentes: Estereomicroscópio marca Coleman, modelo Stand-D 405T com câmera digital; microscópio Olympus modelo CX31, câmera digital Olympus modelo SC100; câmara de saturação (Ethik Technology – modelo Jarstest 218-3LDB); Coluna de flotação; e compressor de ar da marca Schulz modelo CSD – 9. 6.5 Interação microbolha-parasito. Amostras representativas de quinze espécies de parasitos intestinais previamente processadas pela técnica de TF-Test Conventional serão levadas ao procedimento de FAD, com o intuito de compreender a atuação das microbolhas para com os parasitos. 6.6 Ensaios de flotação e avaliações de recuperação parasitária. Com o uso do sedimento obtido pela técnica parasitológica TF-Test Conventional e diluído água tratada obtendo uma suspensão fecal (3mL), as amostras serão submetidas aos ensaios de FAD. Com o uso de pipeta automática graduada, 50 L do material sedimentado obtido pelos dois processos (flotado e não flotado) serão transferidos para lâminas de microscopia. Os ovos e larvas de helmintos observados serão quantificados (contador manual) após a varredura completa da laminula em vinte lâminas de microscopia (sobrenadante flotado = 10 lâminas, e sedimento não flotado = 10 lâminas). Critério de Inclusão: Por intervenção de autorização do voluntário mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o critério de inclusão na pesquisa será a entrega de amostras fecais colhidas nos frascos da técnica parasitológica de TF-Test – Conventional nas indicadas UBS. Critério de Exclusão: Já o critério de exclusão será a entrega de material fecal em quantidade insuficiente para a realização da mesma técnica parasitológica e a falta de entrega do documento TCLE devidamente assinado.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 128  
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
 UF: SP Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.467.727

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:** Este trabalho objetiva desenvolver, avaliar e validar em laboratório uma nova técnica de detecção de parasitos intestinais, a partir da adequação da técnica de Flotação por Ar Dissolvido (FAD), adaptando-a para o exame parasitológico das fezes humanas. **Objetivo Secundário:** - Determinar os reagentes químicos coletores; - Confirmar por registro de imagens e/ou vídeo a ação das microbolhas (com e sem reagente coletor) e interação com espécies parasitárias intestinais; - Avaliar a média percentual de recuperação de estruturas parasitárias (média de larvas-ovos-cistos por lâmina) em diferentes condições físico-químicas; - Definir os valores ótimos dos parâmetros avaliados para uma padronização da técnica de concentração de parasitos intestinais com o uso da FAD; - Avaliar e validar intralaboratorialmente com parâmetros de reprodutibilidade a técnica de FAD, com base na positividade média encontrada desta nova técnica em comparação com as positivities médias da técnica convencional de TF-Test (Conventional); - Calcular a confiabilidade da nova técnica de FAD, a partir da análise estatística paramétrica de sensibilidade, especificidade, intervalo de confiança e concordância Kappa (k) e sua classificação, como: Quase Perfeita, Substancial, Moderada, Fraca e Pobre.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os autores, são considerados riscos: Este estudo proposto não apresenta riscos aos envolvidos em todas suas etapas de desenvolvimento. Como este se trata de um estudo com formato experimental laboratorial (Validação diagnóstica), de modo que o pesquisador não terá contato com o fornecedor do material biológico, esta pesquisa garante o sigilo e a privacidade dos envolvidos. Durante a condução deste estudo serão tomados os cuidados que são descritos nas instruções do protocolo da técnica escolhida. As etapas de coleta, homogeneização, preservação, transporte e processamento laboratorial de amostras fecais, serão realizadas de acordo com as normas de Controle de Qualidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Além disso, serão atendidos e obedecidos todos os critérios de segurança para a realização de processamento laboratorial das mencionadas técnicas parasitológicas, como por exemplo, o uso de luvas descartáveis, óculos de proteção, capela de exaustão de ar e descarte de materiais sólidos e líquidos tóxicos contaminantes em recipientes apropriados, para posterior incineração sob controle do Grupo de Gerenciamento de Resíduos da Coordenadoria Geral da Universidade (CGU) da UNICAMP, de modo a respeitar as normas de Biossegurança e Controle de Qualidade.

Segundo os autores, são considerados benefícios: Os colaboradores deste estudo não terão benefício direto da pesquisa. Porém, as avaliações e validação deste equipamento e procedimento técnico-científico, resultante desta colaboração resultará em ganhos de sensibilidade ao exame

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
 UF: SP Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3521-8038 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.407.727

de fezes, de modo permitir importante Contribuição Social

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Este protocolo se refere ao Projeto de Pesquisa intitulado "DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO LABORATORIAL DE UMA NOVA TÉCNICA DE DETECÇÃO DE PARASITOS INTESTINAIS UTILIZANDO DO PRINCÍPIO DE FLOTAÇÃO POR AR DISSOLVIDO". O protocolo é tema de tese de doutorado do aluno Felipe Augusto Soares, sob orientação de Jancarlo Ferreira Gomes, Professor e Pesquisador Colaborador do Instituto de Computação da UNICAMP, Instituição Proponente. Segundo as Informações Básicas do Projeto, a pesquisa tem orçamento estimado em R\$ R\$ 1.517,40 (Mil, quinhentos e dezessete reais e quarenta centavos) e o cronograma apresentado contempla início do estudo para fevereiro de 2018 e término em Novembro de 2019. O número de participantes é estimado em 500 amostras positivas para parasitas fecais, conferidas pelo Laboratório Municipal de Análises Clínicas (Parasitologia) do município de Campinas – SP.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados os seguintes documentos:

1 - Folha de Rosto Para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos: Foi apresentado o documento "folha rosto cep.pdf" preenchido, datado de 12/01/2018 e assinado. Adequado

2 - Projeto de Pesquisa: Foram analisados os documentos " PROJETO\_CEP.pdf" e " PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1010250.pdf" de 13/12/2017 e 12/01/2018, respectivamente. Adequado.

3 - Orçamento financeiro e fontes de financiamento: " PROJETO\_CEP.pdf" e " PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1010250.pdf" de de 13/12/2017 e 12/01/2018, respectivamente. Adequado

4 - Cronograma: Informações sobre o cronograma incluídas nos documentos "" PROJETO\_CEP.pdf" e "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1010250.pdf" de de 13/12/2017 e 12/01/2018, respectivamente. Adequado.

5 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Documento " TCLE.pdf", de 12/01/2018. Pendência atendida.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
 UF: SP Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.407.727

6 - Currículo do pesquisador principal e demais colaboradores: Contemplados no documento "PROJETO\_CEP.pdf" de 13/12/2017.

7 - Carta de anuência de Instituição onde a coleta será realizada, contemplada no documento "Carta\_anuencia.pdf" de 10/11/2017.

8 - Outros documentos que acompanham o Protocolo de Pesquisa:

- documento de identificação pessoal – "Documento\_Pessoal\_UNICAMP.pdf"

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1. Quanto ao número de participantes:

1.1 Número de participantes inadequado no documento "Folha de rosto".

Pendência atendida.

2. Quanto ao TCLE

2.1 O pesquisador responsável havia elaborado TCLE adequado. No entanto, os campos para assinatura do participante e do pesquisador responsável não se encontravam na mesma página. Pendência atendida.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos ao pesquisador que o estudo só pode ser iniciado após a aprovação pelo CEP, conforme compromisso assumido pelo mesmo com o cumprimento da resolução 466/2012, Item XI.2 letra a. Quando for submeter respostas às pendências, verificar se o cronograma de realização da pesquisa, descrito na plataforma Brasil e no projeto anexado, está contemplando o início da coleta de dados APÓS a liberação do projeto pelo CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento                 | Arquivo                                       | Postagem               | Autor                   | Situação |
|--------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|-------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1010250.pdf | 12/01/2018<br>14:49:00 |                         | Aceito   |
| Outros                         | Carta_Resposta.pdf                            | 12/01/2018<br>14:48:10 | Jancarlo Ferreira Gomes | Aceito   |
| TCLE / Termos de               | TCLE.pdf                                      | 12/01/2018             | Jancarlo Ferreira       | Aceito   |

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
 UF: SP Município: CAMPINAS  
 Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.467.727

|                                           |                               |                     |                         |        |
|-------------------------------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------|--------|
| Assentimento / Justificativa de Ausência  | TCLE.pdf                      | 14:47:38            | Gomes                   | Aceito |
| Folha de Rosto                            | Folha_de_Rosto.pdf            | 12/01/2018 14:46:37 | Jancarlo Ferreira Gomes | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | PROJETO_CEP.pdf               | 13/12/2017 10:15:47 | Jancarlo Ferreira Gomes | Aceito |
| Outros                                    | Documento_Pessoal_UNICAMP.pdf | 10/11/2017 17:31:07 | Jancarlo Ferreira Gomes | Aceito |
| Outros                                    | Carta_anuencia.pdf            | 10/11/2017 16:31:32 | Jancarlo Ferreira Gomes | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 16 de Janeiro de 2018

Assinado por:  
Renata Maria dos Santos Celeghini  
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
UF: SP Município: CAMPINAS  
Telefone: (19)3521-8038 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br