

ESTUDO COMPARATIVO DE TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS DE SEDIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA: KIT COMERCIAL COPROPLUS® 10 E MÉTODO DE HOFFMAN, PONS E JANER – HPJ

Gisele Santos Gonçalves¹
Roberta Dias Rodrigues Rocha²
Bruno Moreira Vieira³
Gabriela Cristina Garófalo⁴
Cristiane Marinho da Silva Costa⁵
Marcela Elisa Pena Belém⁶
Roberta Dias Rodrigues Rocha⁷
Jairo Fernandes dos Reis Júnior⁸

Resumo: No Brasil e nos demais países em desenvolvimento a frequência de parasitoses intestinais ainda se mantém elevada. Atualmente o diagnóstico coparasitológico pode ser realizado com o uso de kits comerciais, que buscam minimizar o contato humano com o material biológico, reduzir o descarte de material de consumo, eliminar os odores e conservar as fezes. O objetivo do presente estudo foi avaliar o grau de concordância do kit comercial Coproplus®, recentemente lançado no mercado, com o Método de Sedimentação Espontânea Hoffman, Pons e Janer – HPJ, técnica-padrão tradicionalmente utilizada em laboratórios de Análises Clínicas. Para a realização do estudo foram utilizadas amostras de fezes, a fresco, resultantes de resíduos de material biológico do Setor de Parasitologia que seriam descartados pelos Laboratórios de Análises Clínicas da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte/MG. Foram selecionadas e codificadas, no laboratório de origem, 52 amostras confirmadas como positivas e 52 amostras confirmadas como negativas, para o ensaio a cego. As 52 amostras negativas foram confirmadas como negativas pelos dois métodos. Entre as 52 amostras positivas, 50 foram positivas pelos dois métodos, enquanto, duas amostras positivas pelo Coproplus® foram negativas para o método HPJ. Os resultados mostram uma concordância excelente entre os métodos de 98,08% (102/104) e um índice kappa=0,96 (IC=0,91 a 1,00). Os dados sugerem que as duas técnicas apresentaram desempenho diagnóstico similar e que o sistema Coproplus®10 apresenta relevantes qualidades operacionais e adequada eficiência, demonstrando que o mesmo apresenta-se apropriado para diagnóstico individual e inquéritos populacionais.

Palavras-chave: Exames coparasitológicos; Métodos de Sedimentação Espontânea; Método de Hoffman, Pons e Janer – HPJ.

Abstract: The intestinal parasitosis frequency still remains high in Brazil and other developing countries. Nowadays, the coparasitological diagnosis can be made with the use of commercial kits, which try to minimize human contact with the biological material, reduce the discharge of consumption material, eliminate odors and maintain the faeces. The goal of this study was to evaluate the agreement degree of the commercial kit Coproplus® recently launched in the market with the Hoffman, Pons and Janer Spontaneous Sedimentation Method - HPJ, standard technique traditionally used in clinical analysis laboratories. For this study, samples of fresh faeces were used, which are resulted from biological waste material of Parasitology industry that would be discarded by the laboratories of Clinical Analyses of the Municipality of Belo Horizonte/MG. 52 samples confirmed as positive and 52 samples confirmed as negative for the blind test were selected and coded in the source laboratory. The 52 negative samples were confirmed as negative by both

methods. Among the 52 positive samples, 50 were positive by both methods, while two positive samples by Coproplus® were negative for HPJ method. The outcomes presented an excellent agreement between the methods of 98.08% (102/104) and a kappa index = 0.96 (CI 0.91 to 1.00). The data suggest that both techniques showed similar diagnosis performance and that the Coproplus®10 system presents relevant operational qualities and proper efficiency, demonstrating that it is appropriate for individual diagnosis and for population surveys

Keywords: Coparasitological exams. Methods of spontaneous sedimentation. Hoffman, Pons and Janner method - HPJ.

1. INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias ou as parasitoses são mais frequentes entre a população com baixo nível socioeconômico. A transmissão da maioria dos parasitos entéricos é oro-fecal, ou seja, pela ingestão de ovos de helmintos e cistos de protozoários presentes em alimentos, água ou por algum objeto contaminado com fezes. Já outros parasitos, como os *Ancilostomídeos* e o *Strongyloides stercoralis* podem ser transmitidos ativamente através da pele (MARINHO *et al.* 2002). As manifestações clínicas mais comuns, causadas pelos parasitos intestinais no hospedeiro, são: diarreia, sangramento gastrointestinal, anemia, perda de peso, dores abdominais, ansiedade, nervosismo, inquietação e, em situações críticas, até mesmo ao óbito (ABRAHAM *et al.*, 2007).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2006) estima-se que o número de indivíduos parasitados no mundo seja de aproximadamente 3,5 bilhões de pessoas. No Brasil, os estudos mais recentes sobre a prevalência de enteroparasitoses são escassos e dispersos, há dificuldade em se realizar exames coproparasitológicos em maior escala e maioria desses estudos utiliza amostras de bases populacionais mal definidas (ANDRADE *et al.*, 2011). Apesar dessas limitações, os estudos têm sugerido que as parasitoses ainda se encontram disseminadas e com alta prevalência, com cerca de 130 milhões de brasileiros acometidos por alguma espécie de parasito intestinal (CAMPOS *et al.*, 1988; HOSHINO-SHIMIZU *et al.*, 2003).

O diagnóstico clínico acurado das parasitoses intestinais é uma tarefa difícil, por isso torna-se necessário a realização do exame laboratorial parasitológico como método de auxílio para a diferenciação do agente etiológico. Desta forma, a demonstração morfológica do(s) estágio(s) de diagnóstico é o principal meio para estabelecer uma diagnose diferencial e definitiva (DE CARLI & OLIVEIRA, 2001).

Para o estudo coproparasitológico e o diagnóstico

definitivo das parasitoses, atualmente contamos com a existência de inúmeros métodos qualitativos de diagnóstico laboratorial. No entanto, esses testes ainda recebem críticas devido às limitações que apresentam no que diz respeito à execução da técnica, à baixa sensibilidade e até mesmo em relação ao custo para a realização. Estas limitações acabam por restringir a utilização de alguns métodos na rotina de laboratórios de análises clínicas particulares, públicos e até em trabalhos de pesquisa acadêmica.

Para a obtenção de um diagnóstico parasitológico é necessário um método de alta sensibilidade e especificidade para a visualização de estruturas parasitárias intestinais, uma vez que o tratamento específico do paciente fica dependente dessas condições. Diante dessa demanda de uma melhor técnica de diagnóstico parasitológico e que possa atender tanto as necessidades dos laboratórios de análises clínicas quanto das pesquisas e projetos acadêmicos, surgiu no mercado o Coproplus® (NL Diagnóstica, Comércio Exterior, São Paulo/SP) que procura agregar alta eficiência, simplicidade e praticidade no manuseio e baixo custo.

Considerando a necessidade de se avaliar o desempenho desta nova técnica, a proposta desse trabalho é avaliar o grau de concordância entre dois métodos de Sedimentação Espontânea: o kit comercial Sistema Coproplus®10 (NL Diagnóstica, Comércio Exterior, São Paulo/SP), recentemente lançado no mercado, com o Método Hoffman, Pons e Janner – HPJ, técnica-padrão tradicionalmente utilizada em laboratórios de Análises Clínicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras fecais - Para o estudo foram utilizadas 104 amostras de fezes, a fresco, resultantes de resíduos de material biológico fecal do Setor de Parasitologia que seriam descartados pelos Laboratórios de Análises Clínicas da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte/MG. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesqui-

sa (CEP) do Centro Universitário Newton Paiva (CAAE 43105115.8.0000.5097). Foram selecionadas e codificadas, pelo funcionário do setor de parasitologia, 52 amostras confirmadas como positivas e 52 amostras confirmadas como negativas pelo laboratório, para o ensaio a cego. As amostras de fezes selecionadas foram divididas em duas alíquotas, sendo uma parte separada para processamento pelo sistema comercial Coproplus®10, conforme as instruções do fabricante (NL Diagnóstica, Comércio Exterior, São Paulo/SP) e a outra para processamento pelo Método Hoffman, Pons e Janer – HPJ (1934). Ao término das análises os códigos foram revelados e associados ao número da amostra.

Processamento das amostras - Os exames parasitológicos de fezes foram executados no Laboratório Escola de Análises Clínicas do curso de Farmácia do Centro Universitário da Newton Paiva-BH/MG, durante o período compreendido entre março a setembro 2015. Foram realizadas as técnicas parasitológicas baseadas no princípio de Sedimentação Espontânea: o Kit Comercial Coproplus®10 e o Método de Hoffman, Pons e Janer – HPJ (1934).

Método Kit comercial Coproplus®10 (NL Diagnóstica, Comércio Exterior, São Paulo/SP): Foi transferida uma quantidade de fezes equivalente a pequena pá, que acompanha o kit, para o frasco coletor Coproplus®10 que contém 13 mL de formalina a 10% tamponada. O frasco foi fechado, submetido a movimentos circulares por um a dois minutos para dissolver as fezes e armazenado a temperatura ambiente por no máximo uma semana. No dia da análise parasitológica, o frasco foi colocado na bandeja de sedimentação por 15 minutos. Transcorrido o tempo, foi transferido uma alíquota do líquido sedimentado em uma lâmina de vidro, adicionado uma gota de Lugol e a lâmina coberta com uma lamínula. Por fim, a lâmina foi submetida à visualização em microscópio óptico com aumento de 10X e 40X. Para cada amostra foi

realizada a leitura de três lâminas.

Método de Hoffman, Pons e Janer – HPJ (1934): Aproximadamente 2 a 4 g de fezes foram homogeneizadas em um copo plástico descartável com água e transferidas para um cálice de sedimentação de 100 mL, através de gaze dobrada em quatro. Após a filtração o cálice foi completado com água e homogeneizado com bastão de vidro. O filtrado presente no cálice foi deixado em repouso por 24 horas. Com uma pipeta tampada, retirou-se uma amostra do fundo do vértice do cálice, destampando a pipeta após emergi-la, para não revolver o sedimento. Colhido o sedimento, desprezou-se a primeira gota e gotejou-se uma alíquota na lâmina de vidro e a lâmina coberta com uma lamínula. Por fim, a lâmina foi submetida à visualização em microscópio óptico com aumento de 10X e 40X. Para cada amostra foi realizada a leitura de três lâminas

Análise estatística - Para a análise do índice de concordância foi utilizado o índice kappa (k). Para a interpretação dos valores do coeficiente Kappa foram utilizados os critérios apresentados por Fleis (1985).

3. RESULTADOS

Nesse estudo foram selecionadas e codificadas 104 amostras de fezes, a fresco, sendo 52 amostras sabidamente positivas e 52 amostras sabidamente negativas para o ensaio a cego. Realizados os métodos parasitológicos de sedimentação espontânea as 52 amostras negativas foram confirmadas como negativas pelos dois métodos: o Kit Comercial Coproplus®10 e o Método de Hoffman, Pons e Janer – HPJ. No grupo de 52 amostras positivas, 50 foram positivas por ambos os métodos, enquanto, duas amostras positivas pelo Coproplus®10 foram negativas para o método HPJ (Tabela 1). A análise comparativa dos resultados mostrou um grau concordância entre os métodos de 98,08% (102/104) e um índice kappa= 0,96 (IC= 0,91 a 1,00).

Tabela 1 - Concordância entre as técnicas kit Sistema Coproplus®10 e Método Hoffman, Pons e Janer – HPJ em 104 amostras de fezes: 52 amostras positivas e 52 amostras negativas

		Método de Hoffman, Pons e Janer – HPJ		
		Positivo	Negativo	
Coproplus®10	Positivo	50	02	52
	Negativo	00	52	52
	Total	50	54	104

Índice kappa= 0,96 (IC= 0,91 a 1,00)

4. DISCUSSÃO

Para o diagnóstico laboratorial das enteroparasitoses faz-se necessário a utilização de um método de alta sensibilidade e especificidade, que visualize com segurança e eficiência as estruturas parasitárias intestinais eliminadas nas fezes, uma vez que o tratamento específico do paciente é dependente dessa informação. As parasitoses intestinais ainda são um grande problema de saúde pública, sendo as crianças com baixo nível socioeconômico as mais atingidas. Desta forma, é muito importante a metodologia utilizada para realização do exame parasitológico de fezes com o objetivo de reduzir cada vez mais o número de resultados falso negativo.

Diante da demanda de técnicas de diagnóstico parasitológico que possam atender as necessidades dos laboratórios de análises clínicas bem como os laboratórios de pesquisas e projetos acadêmicos cada vez mais, são lançados no mercado sistemas comerciais coproparasitológicos. No final da década de 1980 passou a ser comercializado no Brasil um kit comercial para exame parasitológico de fezes denominado Coprotest® (NL Comércio Exterior Ltda., São Paulo, Brasil), um processo simplificado e seguro de sedimentação por centrifugação (baseado no método de Ritchie). O sistema mostrou-se ser mais higiênico, pois elimina o contato do técnico do laboratório com as fezes além de facilitar a filtração do material. Esse sistema foi avaliado por diferentes autores, com resultados satisfatórios (AMATO-NETO *et al.*, 1989; MELLO *et al.*, 1989).

Mais recentemente, em 2008, a mesma empresa apresentou ao mercado o Coproplus® (NL Diagnóstica, Comércio Exterior, São Paulo, Brasil). O Coproplus® é um método mais moderno que foi lançado para corrigir algumas falhas e aprimorar a técnica do Coprotest®. Trata-se de um método de sedimentação espontânea e seu principal objetivo é ser rápido e eficiente ao mesmo tempo. Esse método vem sendo utilizado por muitos laboratórios e os resultados obtidos sugerem ser um sistema satisfatório, entretanto, são escassos os trabalhos que apresentam o desempenho da técnica (FREGONESI, 2015).

Diante deste contexto e considerando a necessidade de se conhecer o desempenho deste sistema, a proposta do presente trabalho foi comparar o desempenho do Coproplus®10 com um método de mesmo princípio, neste caso, o Método de Hoffman, Pons e Janer – HPJ.

A metodologia HPJ (1934) foi escolhida para análise comparativa ao Coproplus®10 por se tratar de um método parasitológico de mesmo princípio, a sedimentação espontânea, e por tratar-se do método padrão-ouro para o diagnóstico de enteroparasitose. O HPJ (1934) é a téc-

nica mais utilizada nos laboratórios de parasitologia, por apresentar fácil manuseio, baixo custo e boa sensibilidade na detecção de cisto de protozoários, larva e ovos de helmintos em amostras formada, pastosa e semi-pastosa.

Para este estudo utilizou-se o Coproplus®10, embora haja outras apresentações do kit. A solução de formaldeído (formalina tamponada) é usada para a fixação dos estágios de diagnóstico de formas evolutivas de protozoários e helmintos. Duas concentrações são recomendadas: 5% especialmente para a fixação de cistos de protozoários e 10% especialmente para ovos e larvas de helmintos (DE CARLI & OLIVEIRA, 2001). Para este estudo optou-se então por utilizar o Coproplus®10 que contém no frasco coletor, como solução conservante, 13 mL de Formalina a 10% tamponada, sendo, portanto, adequada para conservação de cistos e ovos.

Aplicadas às duas técnicas, os resultados de percentual de concordância 98,08% (102/104) e um índice kappa= 0,96 (IC= 0,91 a 1,00), sugerem que os métodos de sedimentação espontânea HPJ e Coproplus®10 apresentam um grau de concordância excelente, segundo a classificação de Fleis (1985). Quanto ao sistema comercial, esse se mostrou como de mais fácil aplicação, com vantagens de otimização do procedimento, do tempo e do espaço físico.

Em relação à coleta e conservação das amostras o kit Coproplus®10 permite uma coleta padronizada e reduzida do material fecal, bem como a possibilidade de coletas múltiplas (um mesmo frasco pode ser utilizado para a coleta de um a três amostras) o que proporciona uma maior sensibilidade a técnica. Com a formalina 10% tamponada é possível a conservação das amostras por até 30 dias, sem a necessidade de refrigeração.

No entanto, vale ressaltar que uma identificação segura e correta de um parasito depende de vários critérios, entre eles uma colheita bem-feita e a uma boa preservação dos espécimes fecais. Não pode ser esquecido que um material fecal inadequadamente colhido, velho ou mal preservado, será de pequeno valor, mesmo como uma boa execução da técnica de diagnóstico laboratorial. Os espécimes submetidos ao exame em condições ótimas deverão ser coletados recentemente, sem contaminação, e convenientemente preservados.

Frequentemente fragmentos de alimentos, células vegetais, grãos de pólen, leucócitos, e outros artefatos presentes nas fezes podem assemelhar-se a certas espécies de parasitos, mas um cuidadoso exame revelará características que determinarão o diagnóstico do parasito. Nesse sentido, com relação à execução da metodologia, o Coproplus® 10, oferece um sistema

de dupla filtragem, com um microfiltro interno, além do tradicional filtro cônico, que assegura uma maior superfície de contato para separação de impurezas, tornando o sedimento mais limpo, e isento de inúmeros detritos, facilitando a identificação dos parasitos presentes na amostra. Neste estudo avaliação microscopia das amostras em conservante foi realizada em um prazo máximo de uma semana de preservação e neste período foi observada uma adequada conservação da morfologia de cistos, ovos e larvas. Os resultados negativos do HPJ para as duas amostras podem ser devidos a má homogeneização da amostra, coleta de uma porção sem a presença das formas evolutivas, transferência de uma alíquota sem formas evolutivas ou erro humano.

O Coproplus®10 mostrou-se de fácil aplicação, pois minimiza o contato com as fezes, tanto na coleta, quanto na execução do exame, apresentando-se como uma metodologia rápida, prática e higiênica. Demanda menor espaço físico para manuseio das amostras e para a leitura das mesmas. Outra vantagem consiste em que seu líquido conservante que ajuda a eliminar o mau odor.

Por outro lado, em relação ao método HPJ o descarte da Coproplus®10 exige um cuidado especial por gerar no laboratório um resíduo potencialmente tóxico ao meio ambiente, no caso a formalina 10%. Sendo assim, é importante ressaltar a responsabilidade com o descarte. O produto e a amostra devem ser descartados de acordo com o programa de gerenciamento de resíduos do laboratório. Para o produto sem contato com a amostra seguir o plano de gerenciamento de resíduos químicos e para a amostra e produto com amostra seguir plano de gerenciamento de resíduos infectantes ou possivelmente infectantes e materiais plásticos.

Com relação a amostragem deste trabalho cabe ressaltar que toda análise para verificação de concordância entre métodos deve partir de um número de amostras (n) estatisticamente significativa (geralmente em torno de 50 amostras), devido à possibilidade de uma interpretação equivocada dos resultados quando avaliada uma pequena (DIAGNOSTEK, 2010). Sempre que o tamanho da amostra do estudo for muito restrito é dificultada a análise e comprometido o desempenho dos testes estatísticos. Neste sentido, o presente trabalho, como um estudo piloto, pretende ter respondido os objetivos propostos com o número amostral (n = 104).

5. CONCLUSÃO

Os dados deste estudo sugerem que as técnicas de sedimentação espontânea HPJ e Coproplus®10 apresentaram eficiência diagnóstica similar e que o sistema Coproplus®10 apresenta qualidades operacionais superiores, como fácil manuseio, dinamismo para preparação e leitura do exame, pequena demanda no espaço físico e adequada eficiência, menor volume de descarte, demonstrando que o mesmo se apresenta apropriado para diagnóstico individual e inquéritos populacionais.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, R. S.; TASHIMA, N. T.; SILVA, M. A. Prevalência de enteroparasitoses em reeducandos da Penitenciária "Maurício Henrique Guimarães Pereira" de Presidente Venceslau-SP. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 39 (1): 39-42, 2007.
- AMATO-NETO, V. et al. Avaliação da utilidade do Coprotest para exame parasitológico das fezes. *Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*, 44(4): 153-5, 1989.
- ANDRADE, Elisabeth Campos. Prevalência de parasitoses intestinais em comunidade quilombola no Município de Bias Fortes, Estado de Minas Gerais, Brasil, 2008. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, v. 20, n. 3, set. 2011. Disponível em <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S167949742011000300008&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 05 Fev. 2016.
- CAMPOS, R.; BRIQUES, W.; BELDA-NETO. *Levantamento multicêntrico de parasitoses intestinais no Brasil*. São Paulo, Rhodia; Grupo Rhône-Poulenc, 1988.
- DE CARLI, G.A.; OLIVEIRA, O.L.M. Controle de Qualidade em Parasitologia Clínica. In: *Parasitologia Clínica - Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas*. São Paulo. Editora Atheneu, 2001.
- FLEIS, A. R. Clinical epidemiology. In: *The architecture of clinical research*. Philadelphia: WB Saunders. p. 185-6, 1985.
- FREGONESI, B.M.; SUZUKI, M.N.; MACHADO, C.S.; TONANI, K.A.A.; FERNANDES, A.P.M.; MONROE, A.A.; CERVI, M.C. Segura-Muñoz S. Emergent and re-emergent parasites in HIV-infected children: immunological and socio-environmental conditions that are involved in the transmission of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol.48, 2015.
- HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. Sedimentation concentration method in schistosome. *Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine*, 1934.
- HOSHINO-SHIMIZU, S.; GOMES, J.F.; DIAS, L.C.S.; ARAUJO, A.J.U.S.; CASTILHO, V.L.P. & NEVES, F.A.M.A. - Detecção de Enteroparasitoses em Amostras Fecais Provenientes de Diferentes Localidades do Estado de São Paulo, Utilizando a Técnica de TF-Test. Rio de Janeiro (RJ). *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 35(2): 46 B, 2003.
- MARINHO, M.S.; SILVA, G.B.; DIELE, C.A.; CARVALHO, J.B. Prevalência de enteroparasitoses em escolares da rede pública de Soropédica, município do estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v.34, n.4, p.195-196, 2002.
- MELLO, R.T. et al. Estudo comparativo entre os métodos Coprotest e de

Hoffman, Pons & Janner no diagnóstico de parasitoses intestinais. *Revista de Farmácia e Bioquímica*, 10(1/2): 9-15, 1989.

OMS, Organização Mundial de Saúde. *Division of Control of Tropical Diseases; intestinal Parasites Control*, Geographical Distribution 2006. Disponível em:<<http://www.who.int/ctd/html/intestburtre.html>>. Acesso em 04 Fev 2016.

NOTAS

1 Professora Orientadora do Centro Universitário Newton Paiva. e-mail: giselesantos@newtonpaiva.br

2 Professora Co-orientadora do Centro Universitário Newton Paiva. e-mail: roberta.rocha@newtonpaiva.br

3 Farmacêutico analista clínico da empresa Mater Dei. e-mail: brunomv88@hotmail.com

4 Graduando em Farmácia e-mail : garofalogaby@hotmail.com

5 Graduando em Enfermagem e-mail: tiane.marinho@gmail.com

6 Farmacêutica na empresa Emfal - Especialidades Químicas. e-mail: marcela_epb@hotmail.com

7 Professora Co-orientadora do Centro Universitário Newton Paiva. e-mail: roberta.rocha@newtonpaiva.br

8 Farmacêutico da Prefeitura de Belo Horizonte e-mail:jairoreis@pbh.gov.br