

DIAGNÓSTICO DE *Echinostoma paraensei* Lie e Basch, 1967 (TREMATODA, ECHINOSTOMATIDE) EM INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Andressa Dordenoni Herbst
José Júnior Faria de Azevedo¹
Victor Menezes Tunholi Alves²

RESUMO

O diagnóstico da infecção por trematódeos é essencialmente baseado na observação microscópica dos ovos dos parasitos nas fezes, através de técnicas qualitativas e quantitativas. Neste estudo, investigou-se a eficiência e sensibilidade das técnicas de Kato-Katz e Hoffman utilizadas para o diagnóstico da infecção experimental de hamsters por *Echinostoma paraensei*. O método de Hoffman apresentou maior sensibilidade e eficiência quando comparado com o método de Kato-Katz para o diagnóstico de *E. paraensei*.

Palavras-chaves: Kato-Katz. Hoffman. *Echinostoma paraensei*. Sensibilidade. Eficiência.

ABSTRACT

The diagnosis of infection with trematodes is essentially based on microscopic observation of eggs of the parasites in the faeces, by quantitative and qualitative techniques. In this study, we investigated the efficiency and sensitivity of the Kato-Katz techniques and Hoffman used for the diagnosis of hamsters experimentally infected *Echinostoma paraensei*. Hoffman's method showed greater efficiency and sensitivity when compared with the Kato-Katz method for the diagnosis of *E. paraensei*.

Keywords: Kato-Katz. Hoffman. *Echinostoma paraensei*. Sensitivity. Efficiency.

¹ Graduandos em Medicina Veterinária pela Faculdade Multivix Castelo

² Doutorado em Ciências Veterinárias pela UFRRJ. Mestrado em Ciências Veterinárias pela UFRRJ. Graduado em Medicina Veterinária pela UFRRJ. Professor da Faculdade Multivix Castelo e Multivix Cachoeiro de Itapemirim.

1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico da infecção por trematódeos é essencialmente baseado na observação microscópica dos ovos dos parasitos nas fezes, através de técnicas qualitativas e quantitativas. Dentre elas, o método de Kato-Katz recebe atenção especial, sendo principalmente utilizado em programas de controle da esquistossomose, além de atuar como ferramenta auxiliar, no diagnóstico quantitativo e qualitativo de outras infecções intestinais induzidas por helmintos (KATO; MIURA, 1954; KATZ et al, 1972; FELDMEIERS; POGGENSEE, 1993).

A eficiência e sensibilidade de técnicas parasitológicas tem sido foco de estudo de alguns autores (TÁPARO, 2006). Embora o método de Kato-Katz seja amplamente utilizado para o diagnóstico de helmintoses intestinais, foram observadas variações significantes quanto a sua eficácia (KONGS et al., 2001). Garcia, Martin e Perez, (1985) observaram que o método de Kato-Katz era mais sensível do que a técnica de sedimentação espontânea para vários helmintos intestinais, enquanto Martin e Beaver (1968) concluíram que a técnica de sedimentação além de ser mais prática, demonstrou maior confiabilidade no diagnóstico qualitativo de alguns parasitos, inclusive para *Schistosoma mansoni*. Resultados similares foram observados por Santos et al. (2005), que ao compararem técnicas de sedimentação espontânea com Kato-Katz, concluíram que esta apresentou menor sensibilidade para determinados helmintos, exceto para *S. mansoni*. Os resultados das técnicas coproparasitológicas semi-quantitativas, permitem estimar a intensidade da infecção, sendo o principal parâmetro considerado para a avaliação da patologia, prognóstico e resposta à quimioterapia (FELDMEIERS; POGGENSEE, 1993).

Os parasitos pertencentes ao gênero *Echinostoma*, caracterizam-se por apresentarem um ciclo biológico complexo, com dois hospedeiros intermediários, e o hábitat restrito à luz intestinal dos hospedeiros definitivos, na qual destacam-se as aves aquáticas, mamíferos, incluindo o homem, répteis e peixes (MALDONADO et al., 2001a, b; KANEV et al., 2000). Possuem como primeiros hospedeiros intermediários moluscos límnicos. (FRIED; GRACZYK, 2000). Em países considerados endêmicos, o hábito cultural de se alimentar a partir de peixes, crustáceos, anfíbios e moluscos aquáticos de águas doces crus ou mal cozidos contendo as metacercárias encistadas

associado às baixas condições socioeconômicas, aumenta o risco de transmissão da equinostomíase humana, bem como de outras doenças de origem alimentar (GRACZYK; FRIED, 1994).

Numerosas técnicas sorológicas têm sido empregadas nos últimos anos para a detecção de anticorpos reativos como ferramenta no diagnóstico de parasitos intestinais (BARBOSA CAMPOS et al., 1988). Entretanto, a possibilidade de uma técnica sorológica substituir exames coproparasitológicos usuais, é reduzida, principalmente devida sua maior complexidade, por se tratar de testes mais caros, de execução mais demorada, ocorrência de reações cruzadas e por serem métodos indiretos.

Assim, ainda hoje, técnicas coproparasitológicas configuram a principal ferramenta no diagnóstico de parasitoses intestinais, e apesar da existência de inúmeros métodos, quantitativos e qualitativos, todos tem sido alvo de críticas, seja em função da alta complexidade e baixa sensibilidade, ou em decorrência do elevado custo de execução, restringindo suas utilizações na rotina laboratorial. Aqui, apresentamos um estudo comparativo das técnicas de Kato-Katz e Hoffman no diagnóstico de *E. paraensei* a partir de fezes de hamsters experimentalmente infectados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostra

Foram examinadas 15 amostras fecais de hamsters infectados por *E. paraensei* utilizados na manutenção do ciclo experimental do parasito no Laboratório de Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios (LABPMR) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ. As amostras de fezes foram coletadas com auxílio de sacos plásticos previamente identificados, mantidas sob refrigeração por vinte e quatro horas até o processamento.

2.2 Exames Parasitológicos de Fezes

O experimento foi realizado no LABPMR, do IOC, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ. As amostras fecais foram homogeneizadas, pesadas e processadas pelas técnicas de Hoffman e Kato-Katz, sendo as leituras realizadas em duplicata.

2.2.1 Método de Hoffman (sedimentação espontânea)

Aproximadamente um grama de fezes foi homogeneizado em água e a solução filtrada em gazes dobradas para um cálice de sedimentação de 100 ml, e o volume completado com água de torneira a temperatura ambiente. Esta suspensão permaneceu em repouso por 30 minutos e posteriormente examinada sob microscópio de luz utilizando objetiva de 20x. Esta é a técnica de rotina empregada no LABPMR.

2.2.2- Método de Kato-Katz

Um grama de fezes foi colocado sobre papel absorvente para a remoção do excesso de umidade. Logo em seguida, uma tela de nylon era comprimida com auxílio de espátula fazendo com que parte das fezes passasse através de suas malhas. Estas foram recolhidas com espátula e comprimidas no orifício de uma placa perfurada, situada sobre uma lâmina, até que este se encontre cheio. O excesso de fezes foi retirado com a lateral da espátula. Posteriormente, a placa perfurada foi removida, inclinando, inicialmente, uma das extremidades de modo a permanecer sobre a lâmina de vidro um cilindro de amostra fecal. Sobre este cilindro foi colocada uma lâmina de celofane, previamente embebida em solução de DIAFIX.

A lâmina foi em seguida invertida sobre uma superfície lisa e pressionada de modo a espalhar uniformemente o material entre lâmina e lamínula evitando o extravasamento das fezes. Aguardou-se 30 minutos a clarificação do esfregaço fecal para posterior análise em microscópio de luz.

2.3 Análises Estatísticas

Foi realizado o teste de Kolmogorov Smirnov, para verificar a normalidade dos dados. Os resultados obtidos foram expressos por média \pm erro padrão e submetido ao teste de Tukey para comparação das médias ($\alpha=5\%$).

3 RESULTADOS

Os resultados indicaram variações significativas quanto à sensibilidade, eficácia e número de ovos recuperados entre os dois métodos coproparasitológicos aplicados no diagnóstico de *E. paraensei*. O método de Hoffman apresentou maior sensibilidade quando comparado ao método de Kato Katz, indicando positividade em todas as quinze amostras examinadas. Em relação ao número de ovos recuperados, o método de Kato Katz apresentou menor eficácia (62.05 ± 14.35) quando comparado ao método de Hoffman (165.60 ± 11.22), resultando em um resultado aproximadamente 62,53% menor no número total de ovos observados.

4 DISCUSSÃO

Os dados obtidos revelam que o método Kato-Katz apresentou uma menor sensibilidade (positividade) e especificidade quando comparado ao método de Hoffman para o diagnóstico de *E. paraensei*. Tais resultados reforçam estudos anteriores, os quais demonstram menor sensibilidade de tal técnica na identificação de certos ovos de helmintos (ZAMEN; CHEONG, 1967). A baixa eficiência da técnica de Kato-Katz aqui observada pode ser em função de alguns problemas inerentes ao próprio método já destacado por alguns autores (KONGS et al., 2001).

Observações prévias remetem a importante variabilidade que os ovos de helmintos podem apresentar (SCOTT, 1938). Desta maneira, durante anos inúmeras adaptações da técnica de Kato-Katz têm sido propostas, visando adaptá-la a diagnóstico de diferentes espécies de helmintos e indicando que o método ideal ainda não foi caracterizado (ENGELS; NDORICIMPA; GRYSEELS, 1993).

O cálculo de ovos por grama através do método de Kato-Katz é baseado no pressuposto de que a densidade de uma amostra de fezes é igual a 1.0. Assim, qualquer parâmetro que afete na consistência das fezes influenciará os resultados. Teesdale et al. (1985) averiguaram que, uma amostra de fezes seca pode apresentar uma contagem de ovos de *S. mansoni* sete vezes maior do que uma amostra úmida obtida a partir do mesmo hospedeiro. Adicionalmente, estudos indicam a não utilização de fezes aquosas, bem como, de amostras fecais muito secas e densamente fibrosas, visto que, culminariam em problemas relacionados diretamente ao diagnóstico semi-quantitativo de tal técnica (FELDMEIER; POGGENSEE, 1993).

No presente estudo, foi observada falta de homogeneidade das lâminas quanto a distribuição dos ovos de *E. paraensei* no método Kato-Katz, provavelmente em decorrência da textura das fezes, corroborando uma ampla variação na contagem de ovos demonstrada pela dispersão dos valores em torno da média e pela grande intensidade do erro-padrão, refletindo desta maneira, uma limitação desta técnica.

Por outro lado, a técnica de Hoffman apresentou maior sensibilidade e eficácia para o diagnóstico de ovos de *E. paraensei*, mesmo a carga parasitária sendo baixa. Resultados similares foram observados por Santos et al., (2005), que através de um estudo comparativo entre métodos coproparasitológicos para diagnóstico de helmintoses intestinais, identificaram uma maior proporção de amostras positivas pela técnica de sedimentação natural em relação a de Kato-Katz, denotando maior confiabilidade aos resultados. Vale ressaltar que, estudos tem demonstrado maior eficiência de técnicas de sedimentação, especialmente o método de Hoffman, para o diagnóstico de helmintoses induzidos por trematódeos (PALUMBO et al., 1976; LEAL, 2003).

Silva e Abboud (2001) avaliando quatro diferentes técnicas (Willis, Faust, Hoffmann e Safranina-azul de metileno) na incidência de endoparasitos de felinos, concluíram que a técnica de Hoffman foi superior na identificação de *Platynosomum* sp. Holanda (1993), após comparar diferentes técnicas no diagnóstico das parasitoses intestinais, atribuiu maior sensibilidade ao método de Hoffman, sendo capaz de indicar 85% de resultados positivos para *S. mansoni* em relação ao método de Ritchie que apresentou apenas 68% de positividade.

Tabela 1. Amostras e resultado da contagem de ovos nas fezes pelas técnicas de Kato-Katz e Hoffman em hamsters.

Identificação dos hamsters	Técnicas coproparasitológicas			
	Kato-Katz		Hoffman	
20101201	30	47	95	90
20101202	12	29	85	82
20101203	13	45	105	67
20101204	130	75	124	92
20101205	31	89	85	77
20101206	12	24	69	105
20101207	28	-	94	83
20101208	66	21	91	98
20101209	09	37	86	79
20101210	54	30	94	88
20101211	43	77	95	75
20101212	17	-	70	97
20101213	-	-	69	57
20101214	-	-	98	68
20101215	-	72	78	96

Tabela 2. Comparação entre as Técnicas Kato-Katz e Hoffman, percentual de positividade e número médio de ovos e erro padrão de *Echinostoma paraensei* em hamsters. $X \pm SEM$ = Média \pm erro-padrão da média.

Técnicas	N	Positivos (%)	$X \pm SEM$
Kato-Katz	15	86.66 (13)	62.05 ± 14.35^a
Hoffman	15	100 (15)	165.60 ± 11.23^b

Letras diferentes indicam médias que diferem entre si ao nível de 5% de significância.

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados, podemos concluir que a técnica que se mostrou mais sensível na recuperação dos ovos deste trematódeo foi a de Hoffman por detectar 100% na comparação com a de Kato Katz.

6 REFERÊNCIAS

- BARBOSA CAMPOS, D. M.; OLIVEIRA, O. S.; BARBOSA, W.; CAMPOS, L. L.; ROSA, Z. S.; SOUZA, O. C. Antígeno de *Strongyloides cebus* (Darling, 1911) no diagnóstico da estrogiloidíase humana. **Revista de Patologia Tropical**, v. 17, p. 17-23.1988.
- ENGELS, D.; NDORICIMPA, S.; GRYSEELS, B. *Schistosoma mansoni* in Burundi: progress in its control since 1985. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 71, p. 207-214, 1993.
- FELDMEIER, H.; POGGENSEE, G. Diagnostic techniques in schistosomiasis control. **Acta Tropica**, v. 52, p. 205-220, 1993.
- FRIED, B; GRACZYK, T. K. Echinostomes as experimental models for biological research. **Kluwer, Dordrecht**, p. 245-266, 2000.
- GARCIA, J. A.; MARTIN, A. M.; PEREZ, M. J. Valoración de los métodos utilizados em el diagnóstico de parasitosis intestinales. **Laboratório 79**: 473, 1985.
- GRACZYK, T. K.; FRIED, B. Elisa method for detecting anti-echinostoma caproni (trematoda;echinostomatidea) immunoglobulins in experimentally infected icr mice. **Journal of Parasitology**, v. 80, n. 4, p. 544-549, 1994.
- HOFFMAN, V. A.; PONS, J. S.; JANER, J. L. Sedimentation concentration method in the *Schistosomiasis mansoni*. **Puerto Rico Journal of Public Health Tropical**, v. 9, p. 283-298, 1934.
- HOLANDA, C. M. C. X. Estudo comparativo entre as tenicas de sedimentação espontanea e a de centrifugo-sedimentação no diagnostico coproparasitologico / A comparative study between the spontaneous sedimentation and the centrifugation-sedimentation techniques inthe coproparasitologic diagnostic. **Revista Brasileira de Analises Clinicas**. v. 25, n. 1, p. 29-32, 1993.
- KANEV, I.; STERNER, M.; RADEV , V.; FRIED. B. An overview of the biology of echinostomes. In: Echinostomes as Experimental Models for Biological *Research*. Eds. Bernard Fried and Taddeus Graczyk. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London: 1-29. 2000.
- KATO, K.; MIURA, M. Comparative examinations. **Japanese Journal of Parasitology**, v. 3, p. 35, 1954.
- KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 14, p. 397-400, 1972.
- KONGS, A.; MARKS, G.; VERLEÂ, P.; STUYFT, P. V. D. The unreliability of the Kato-Katz technique limits its usefulness for evaluating *Schistosoma mansoni* infections. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 3, p 163-169, 2001.

LEAL, P. D. S. Diagnóstico da infecção por *Platynosomum fastosum* (Braun, 1901) Kossack, 1910 (Trematoda: Dicrocoelidae) em gatos domésticos (*Felis catus* L.). 2003. 31f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Faculdade de Medicina Veterinária, **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, 2003.

LIE, K. J.; BASCH, P. F. The life history of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). **Journal of Parasitology**, v. 53, n. 6, p. 1192-1199, 1967.

MALDONADO JR, A.; COURA, R.; GARCIA, J. S.; REINALDA MARISA LANFREDI, R. M.; REY, L. Changes on *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) Worm Load in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) Concurrently Infected with *Echinostoma paraensei* (Digenea: Echinostomatidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, s. I, p. 193-198, 2001a.

MALDONADO JR, A.; LOCKER, E. S.; MORGAN, J. A. T.; REY, L.; LANFREDI, R. M. Description of a new Brazilian isolate of *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Digenea) from its natural vertebrate host *Nectomys squamipes* by light and scanning electron microscopy and molecular analysis. **Parasitology Research**, v. 87, n. 10, p. 840-848, 2001b.

MARTIN, L. K.; BEAVER, P. C. Evaluation of Kato tick-smear technique for quantitative diagnosis of helminth infections. **American Journal of Medical and Tropical Hygiene**, v. 17, p. 382-391, 1968.

PALUMBO, N. E.; TAYLOR, D. O.; PERRI, S. F. Evaluation of Fecal Technics for the Diagnosis of Cat Liver Fluke Infection. **Laboratory Animal Science**, v. 26, n. 3, p. 490-493, 1976.

SANTOS, F. L. N.; CERQUEIRA, E. J. L.; SOARES, N. M. Comparação das técnicas de sedimentação espontânea e Kato-Katz para diagnóstico das helmintoses intestinais, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 196-198, 2005.

SCOTT, J. A. The regularity of egg output of helminth infestations, with special reference to *Schistosoma mansoni*. **American Journal of Hygiene**. v. 27, p. 155-175, 1938.

SILVA, L. L.; ABOUD, L. C. S. Estudo comparativo da Incidência de endoparasitoses entre felinos jovens e adultos. In: **II Congresso Internacional de Medicina Felina- CIMFEL**, 2001, Rio de Janeiro. *Anais do II Congresso Internacional de Medicina Felina – CIMFEL*. Rio de Janeiro. 2001. p. 30.

TÁPARO, C. V.; PERRI, S. H. V.; SERRANO, A. C. M.; ISHIZAKI, M. N.; COSTA, T. P.; AMARANTE, A. F. T.; BRESCIANI, K. D. S. Comparação entre técnicas coproparasitológicas no diagnóstico de ovos de helmintos e oocisto de protozoários em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2006

TEESDALE, C. H.; FAHRINGER, K.; CHITSULO, L. Egg count variability and sensitivity of a thin smear technique for the diagnosis of *Schistosoma mansoni*.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 79, p. 369-373, 1985.

ZAMEN, V.; CHEONG, C. H. A comparison of Kato thick smear technique with zinc sulfate flotation method, for the detection of helminth ova in faeces. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, p. 751, 1967.