

## AValiação DO TESTE DE ECLOsÃO DE MIRACÍDIOS NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Fábio ZICKER, Naftale KATZ e Josef WOLF

### RESUMO

Foi padronizada uma técnica semi-quantitativa de eclosão de ovos de *S. mansoni* com finalidade diagnóstica. Usaram-se frascos de "Stoll" onde 4 ml de fezes foram emulsionadas em 56 ml de água desclorada a 4°C. Após lavagens sucessivas, o sedimento foi exposto no próprio frasco a uma lâmpada de 60 watts por 2 horas visando à eclosão dos ovos. Para facilitar a visualização dos miracídios, foi construída uma caixa com iluminação tipo "campo escuro" e onde o frasco era colocado e examinado até 24 horas após. Quando foram adicionados 1 e 5 ovos de *S. mansoni* por g de fezes para avaliar a sensibilidade do teste de eclosão obtiveram-se respectivamente 80,0 e 90,0% de positividade nos exames. Com 12 a 50 ovos por g de fezes foi de 100% a positividade. Em 1046 amostras de fezes onde foram comparados os métodos de eclosão e método quantitativo de Kato-Katz, 441 exames foram positivos por um dos dois métodos. O método Kato-Katz isoladamente revelou 86,8% dos positivos e a eclosão, 89,3%. Em 341 exames de controle realizados após o tratamento de 80 pacientes esquistossomóticos, 58 foram positivos por um dos dois métodos, sendo que 4 foram negativos pela eclosão e 3 pelo método quantitativo de Kato-Katz. Os resultados mostram que a eclosão tem seu valor quando utilizada como método auxiliar no diagnóstico da esquistossomose e principalmente, para a avaliação terapêutica de agentes esquistossomicidas.

### INTRODUÇÃO

A eclosão do miracídio de ovos de *Schistosoma* foi estudada por diversos Autores visando principalmente determinar os fatores físicos, químicos e biológicos que regulam esse fenômeno. De fato, STANDEN<sup>26</sup> & MALDONADO & col.<sup>15-18</sup> demonstraram a importância da pressão osmótica, temperatura, luz e pH no processo de eclosão de ovos de *S. mansoni*.

PITCHFORD & VISSER<sup>22</sup> observaram que o número de miracídios de *S. mansoni* eclodidos era proporcional ao tempo de diluição das fezes sendo que a eclosão se iniciaria principalmente 24 horas após e se processaria até 6 dias.

Estudos semelhantes foram realizados

com ovos de *S. japonicum*<sup>7,8,14,27</sup> e *S. haematobium*<sup>19</sup>. A avaliação do teste de eclosão de miracídios como método diagnóstico foi também estudada, principalmente para o *S. japonicum*<sup>21</sup> e *S. haematobium*<sup>19</sup>, sendo que no Brasil não existe nenhuma publicação sobre o valor desse teste na esquistossomose mansônica.

Em nosso trabalho são descritos uma técnica semi-quantitativa para eclosão de miracídios e um novo aparelho que permite a sua visualização mais facilmente, apresentando-se também o método de análise da sensibilidade desse teste e o estudo comparativo com o exame de fezes realizado pelo método quantitativo de KATO-KATZ<sup>10</sup>.

Trabalho realizado no Centro de Pesquisas «René Rachou» — Fundação Oswaldo Cruz e Seção de Parasitoses da Prefeitura de Belo Horizonte, com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq.) Separatas: NAFTALE KATZ, Caixa Postal, 1743, Belo Horizonte, 30000 MG — Brasil

## MATERIAL E MÉTODOS

### I — Descrição do teste de eclosão de miracídios

Foram usados os frascos de "Stoll" onde 4 ml de fezes são emulsionados em 56 ml de água desclorada. A suspensão foi filtrada através de uma tela de nylon com malhas de 500  $\mu$  de diâmetro, seu volume completado com água fria, e deixada sedimentar na geladeira (4°C) por 30 minutos. Em seguida foi aspirado o sobrenadante e completado o volume com água a 4°C. Essas lavagens foram feitas até que o sobrenadante se tornasse claro. Após a última lavagem o sedimento foi ressuspenso em água numa temperatura aproximada de 28°C e o mesmo frasco colocado sob lâmpada de 60W para a eclosão dos ovos. Foram feitas leituras 2 e 24 horas após a exposição à luz. Para leitura, o frasco foi colocado numa caixa especial com iluminação tipo "campo escuro" onde os miracídios são facilmente vistos (Fig. 1). Esta caixa com dimensões aproximadas de 50 x 30 cm foi feita com papelão revestida com papel preto tendo somente uma abertura para o exterior do formato do frasco onde se encontra a suspensão.

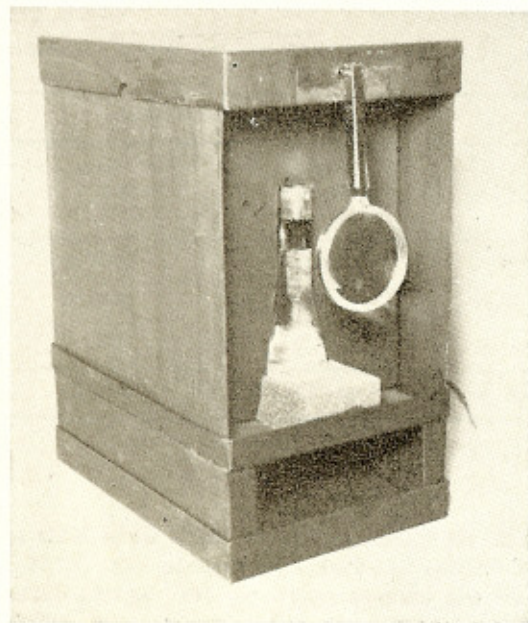


Fig. 1 — Aparelho especial para visualização dos miracídios

No interior da caixa em torno dessa abertura existe um sistema de iluminação que dá origem ao "campo escuro" através do orifício onde o tubo é colocado para a leitura. Em posição anterior ao tubo existe fixa uma lupa que facilita a visualização dos miracídios (Fig. 2).

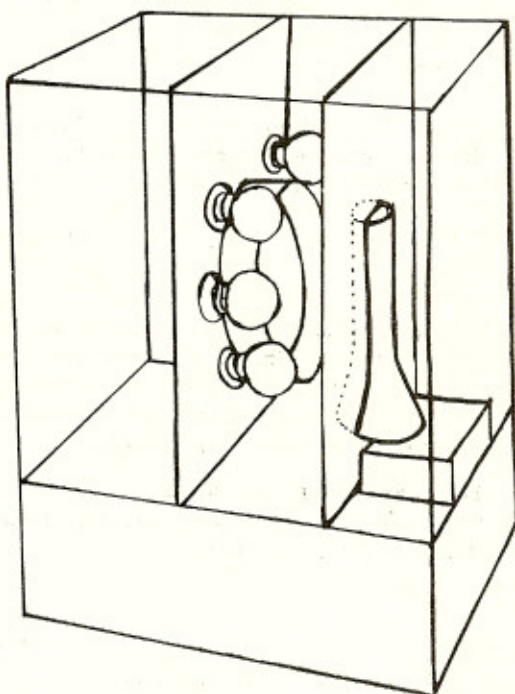


Fig. 2 — Esquema do aparelho com iluminação tipo «campo escuro» para visualização dos miracídios

### II — Análise da sensibilidade do teste de eclosão

Ovos maduros de *S. mansoni* foram obtidos de fezes de indivíduos parasitados, de acordo com a técnica de RITCHIE & BERRIOS-DURAN<sup>24</sup> e após exame e contagem ao microscópio foram misturados a fezes de indivíduos não parasitados (KATZ & CHAIA<sup>9</sup>) e preparadas para o teste de eclosão. Foram utilizadas concentrações de 50, 20, 12, 5 e 1 ovos por g de fezes sendo realizados 5 exames com cada uma das três primeiras concentrações e 10 exames com as duas últimas. As leituras foram feitas 2 e 24 horas após a preparação dos exames.

### III — Comparação entre a eclosão e o método quantitativo de Kato-Katz no diagnóstico da esquistossomose

Foi feita uma comparação entre o método quantitativo de KATO-KATZ<sup>10</sup> e o teste de eclosão em 1046 amostras de fezes. Foi preparado 1 exame de cada amostra pela técnica de eclosão e 2 lâminas pela técnica de Kato-Katz. Os 1046 exames foram divididos em 3 grupos de acordo com a origem das fezes, a saber:

**Grupo A** — 192 exames de indivíduos que eliminavam ovos de *S. mansoni* nas fezes em exames realizados anteriormente;

**Grupo B** — 329 exames de indivíduos sem diagnóstico;

**Grupo C** — 525 exames de pacientes esquistossomóticos realizados antes ou do 1.º ao 4.º mês após o tratamento com oxamniquine. Neste grupo, foram analisados separadamente 341 exames de 80 indivíduos tratados.

Esses exames foram realizados do 1.º ao 4.º mês após o tratamento, pelos dois métodos para avaliação de cura.

### RESULTADOS

Na Tabela I está representada a positividade do teste da eclosão em relação à concentração de ovos/g de fezes. Para concentrações de ovos iguais ou superiores a 12 ovos/g, 100% das preparações foram positivas. Nas concentrações de 5 e 1 ovos/g obteve-se respectivamente 90,0 e 80,0% de positividade nos exames realizados.

Na Tabela II estão os resultados dos 1046 exames realizados pelo teste de eclosão e pelo método de Kato-Katz nos três grupos de indivíduos.

T A B E L A I

Positividade do teste de eclosão em relação à concentração de ovos *S. mansoni* por g de fezes

Nº de ovos adicionados por g de fezes	Nº de frascos examinados	Nº (%) de frascos com miracídios
50	5	5 (100)
20	5	5 (100)
12	5	5 (100)
5	10	9 (90)
1	10	8 (80)

T A B E L A II

Resultado de 1046 exames de fezes realizados pelos métodos de Kato-Katz e eclosão nos três grupos de pacientes

Total exames	Resultados Positivos			Resultados Positivos		
	Kato-Katz e/ou eclosão	Kato-Katz	Eclosão	Kato-Katz (+) Eclosão (-)	Kato-Katz (-) Eclosão (+)	
A	192	92(100,0)	80(86,9)	87(94,7)	5(5,3)	12(13,1)
B	329	126(100,0)	100(79,3)	102(80,9)	24(19,1)	26(20,7)
C	525	223(100,0)	203(91,0)	205(91,9)	18(8,1)	20(9,0)
Total	1046	441(100,0)	383(86,8)	394(89,3)	47(10,7)	58(13,2)

( ) = porcentagem

Os resultados obtidos nos três grupos foram bastante semelhantes com diferenças pouco significativas entre os dois métodos. O Kato-Katz revelou 86,9, 79,3 e 91,0% dos casos positivos e o teste de eclosão 94,7, 80,9 e 91,9% nos três grupos respectivamente. Num

total de 441 exames positivos, o Kato-Katz revelou 383 (86,8%) e a eclosão 394 (89,3%). Dos 441 exames positivos, 105 (23,9%) foram discordantes entre os dois métodos, 47 (10,7%) positivos pelo Kato-Katz e 58 (13,2%) exames positivos pela eclosão.

Calculando o valor da mediana do número de ovos de *S. mansoni* por g de fezes nos 47 exames pelo método de Kato-Katz, nos quais a eclosão foi negativa, encontrou-se o valor de 64 enquanto a mediana dos 336 exames com resultados positivos para os dois métodos foi de 150.

Quando os dois métodos foram comparados para avaliação de cura dos pacientes tratados, 58 dos 341 exames realizados foram positivos considerando o resultado pelos dois métodos, sendo que em 7 casos (12,0%) os resultados foram discordantes. Em quatro exames negativos pelo teste de eclosão encontrou-se 66, 10, 12 e 12 ovos por g de fezes no Kato-Katz, e em três exames negativos para o Kato-Katz foram positivos pela eclosão, sendo que em exames anteriores esses pacientes tinham 22 e 80 ovos por g de fezes.

## DISCUSSÃO

Para estudos clínicos ou ensaios terapêuticos na esquistossomose, bem como para a avaliação do controle dessa endemia é muito importante poder se contar com um método que seja quantitativo, de fácil execução, sensível, pouco dispendioso e que possibilite o seu emprego em larga escala.

No primeiro encontro de Pesquisadores em Medicina Tropical realizado sob o patrocínio do Instituto de Pesquisas Johnson & Johnson de Doenças Endêmicas em 1973 e que teve suas conclusões referendadas pela assembléia geral do X.º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical<sup>5</sup>, realizado em Curitiba em 1974, o método Kato-Katz, foi apontado como aquele que deveria ser utilizado para o diagnóstico e avaliação de agentes terapêuticos na esquistossomose.

De fato, em trabalhos anteriores, KATZ & col.<sup>11</sup>, KATZ & ZICKER<sup>12</sup>, COURA & CONCEIÇÃO<sup>2</sup> demonstraram ter o método quantitativo de Kato-Katz muito valor nos estudos da esquistossomose. Na avaliação dos novos agentes esquistossomicidas este método vem sendo amplamente utilizado, por COURA & col.<sup>3</sup>, COUTINHO & col.<sup>4</sup>, KATZ & col.<sup>13</sup>, PRATA & col.<sup>23</sup>, SILVA & col.<sup>25</sup>, PEDRO & col.<sup>20</sup> entre outros pesquisadores.

O teste de eclosão de miracídios apesar de ser utilizado amplamente por investigadores

em áreas onde predominam o *S. haematobium* ou *S. japonicum* ainda não havia sido devidamente avaliado no Brasil onde o *S. mansoni* é o único prevalente.

No presente trabalho, descreve-se nova técnica que pode fazer com que o teste de eclosão torne-se quantitativo. De fato, como parte de um volume conhecido de fezes, basta que sejam contados todos os miracídios eclodidos e ter-se-á o número de miracídios por g de fezes.

Por outro lado, o aparelho ora descrito, que tem como princípio a iluminação tipo "campo escuro" permite o exame mais apurado e rápido dos frascos onde se encontram os miracídios. O teste de eclosão é muito sensível revelando 80% dos exames que apresentavam até 1 ovo de *S. mansoni* por g de fezes (Tabela I).

Quando o teste de eclosão foi comparado ao método de exames de fezes quantitativo de Kato-Katz a concordância nos diferentes grupos estudados esteve entre 80 e 90%, seja para o diagnóstico dos casos de *S. mansoni* ou na avaliação de cura.

Para avaliação terapêutica, deve-se assinalar que quando foram examinadas 341 amostras de 80 pacientes tratados com um agente esquistossomicida foram encontrados 58 exames positivos por um dos dois métodos. Nestes, 7 exames (12,0%) apresentaram resultados discordantes ou seja 4 foram negativos pelo teste de eclosão e 3 pelo método de Kato-Katz. Saliente-se que nestes exames o número de ovos de *S. mansoni* eliminados pelas fezes era pequeno (menos de 66 ovos por g), fato que provavelmente ocasionou a discordância nos resultados obtidos pelos dois métodos.

Apesar do teste de eclosão utilizar-se de 4 ml de fezes e o método de Kato-Katz de quase 10 vezes menos, os resultados mostram que ambas as técnicas são equivalentes.

O teste de eclosão serve também para confirmação da viabilidade dos ovos de *S. mansoni* e pode ser empregado como técnica complementar no diagnóstico da esquistossomose, principalmente para a avaliação terapêutica de agentes esquistossomicidas.

## S U M M A R Y

### Evaluation of a new semi-quantitative hatching technique of *S. mansoni* eggs for diagnostic purposes

A new semi-quantitative hatching technique has been standardized for diagnostic purposes of *S. mansoni* eggs. There have been employed "Stoll" flasks where 4 ml feces were emulsified in 56 ml dechlorinated water at 4°C. After successive washings, the sediment, still in the flask, was exposed to a 60-watt lamp, for 2 hours, to make the eggs hatch. To enhance the visualization of the miracidia, there has been devised a box with "dark-field" illumination, where the tube is placed and examined for up to 24 hours.

When 1 to 5 *S. mansoni* eggs were added (per gram of feces) so as to evaluate the sensitivity of the hatching test, percentages of 80.0 and 90.0% of positive examinations were obtained. By adding 12 to 50 eggs (per gram of feces) the positivity rate was 100%.

From 1046 faeces samples examined for comparing the sensitivity of the hatching technique with that of Kato-Katz quantitative stool examination, 441 were found to be positive by one of the two methods, Kato-Katz technique having revealed 86.8% of the positive tests and the hatching method, 89.3%.

In 341 exams from 80 already treated schistosome patients, 58 tests were found to be positive by one of the two techniques, the hatching method having been negative in 4 cases and Kato-Katz' method in 3 of them.

The data obtained have shown the hatching technique to be helpful as an auxiliary tool for the diagnosis of schistosomiasis and, especially, for the assessment of therapeutic activity of schistosomicidal agents.

## H O M E N A G E M

Este trabalho é uma homenagem póstuma ao SR. JOSEF WOLF, especialista em fotografia científica que faleceu em 9 de junho de 1973 após ter contribuído decisivamente durante muitos anos nas pesquisas científicas desenvolvidas no Centro de Pesquisas "René Rachou" — INERu.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BLAIR, D. M.; WEBER, M. C. & CLARKE, U. V. — Macroscopic and microscopic methods in the diagnosis of intestinal bilharziasis. *Cent. Afr. J. Med.* 15: 2-8, 1969.
2. COURA, J. R. & CONCEIÇÃO, M. J. — Estudo comparativo dos métodos de Lutz, Kato e Simões Barbosa. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 8: 153-158, 1974.
3. COURA, J. R.; ARGENTO, C. A.; FIGUEIREDO, N. de; WANKE, B. & QUEIROZ, G. C. de — Clinical trial with Oxamniquine (U.K. 4271) — in the treatment of Schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15 (Supl. 1): 41-46, 1973.
4. COUTINHO, A.; DOMINGUES, A. L. C. & BONFIM, J. R. A. — Treatment of mansoni schistosomiasis with oxamniquine. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15 (Supl. 1): 15-34, 1973.
5. Encontro de Pesquisadores em Medicina Tropical — Primeiro — Metodologia para avaliação terapêutica de drogas antiparasitárias: I — Parasitos Intestinais. *Anais de Medicina*, Universidade Federal do Paraná 89-99, 1973-1974.
6. FAUST, E. C. & MELENEY, H. E. — Studies on schistosomiasis japonica. *Amer. J. Hyg. Monogr./Ser./3* 1: 339, 1924.
7. INGALLS, J. W.; HUNTER, G. W.; MC MULLEN, D. B. & BAUMAN, P. M. — The molluscan intermediate host and schistosomiasis japonica. I — Observations on the conditions governing the hatching of eggs of *S. japonicum*. *J. Parasit.* 35: 147-151, 1949.
8. ITO, J. — Hatchability of *S. japonicum* eggs. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 8: 176-185, 1955.
9. KATZ, N. & CHAIA, G. — Coprological diagnosis of Schistosomiasis. I — Evaluation of quantitative techniques. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 10: 295-298, 1968.
10. KATZ, N.; CHAVES, A. & PELLEGRINO, J. — A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 14: 397-402, 1972.
11. KATZ, N.; COELHO, P. M. Z. & PELLEGRINO, J. — Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *Schistosoma mansoni* eggs added to human feces. *J. Parasit.* 56: 1032-1033, 1970.
12. KATZ, N. & ZICKER, F. — Correlation between symptomatology and intensity of *Schistosoma mansoni* infection in inhabitants from endemic areas in the State Minas Gerais. *Brasília Med.* 11: 55-59, 1975.
13. KATZ, N.; PELLEGRINO, J.; GRINBAUM, B.; CHAVES, A. & ZICKER, F. — Further clinical trials with oxamniquine, a new antischistosomal

- agent. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15 (Supl. 1): 35-40, 1973.
14. MAGATH, C. T. B. & MATHIESON, L. D. R. — Factors affecting the hatching of ova of *S. japonicum*. *J. Parasit.* 32: 64-68, 1946.
  15. MALDONADO, J. F. & ACOSTA-MATIENZO, J. — Biological studies on the miracidium of *S. mansoni*, Part I — Hatchability, longevity and infectivity of the miracidium. *Amer. J. Trop. Med.* 28: 645-657, 1948.
  16. MALDONADO, J. F.; ACOSTA-MATIENZO, J. & THILLET, C. J. — Biological studies on the miracidium of *S. mansoni*. Part II — Behavior of the unhatched miracidium in undiluted stool, under diverse environmental conditions. *Puerto Rico J. Pub. Health & Trop. Med.* 25: 154-169, 1949.
  17. MALDONADO, J. F.; ACOSTA-MATIENZO, J. & VELLEZ-HERRERA, F. — Biological studies on the miracidium of *S. mansoni*. Part III — The role of light and temperature in hatching. *Puerto Rico J. Pub. Health & Trop. Med.* 25: 359-376, 1950.
  18. MALDONADO, J. F.; ACOSTA-MATIENZO, J. & VELLEZ-HERRERA, F. — Biological studies on the miracidium of *S. mansoni*. Part IV — The role of pH in hatching and longevity. *Puerto Rico J. Publ. Health & Trop. Med.* 26: 85-91, 1951.
  19. MEESER, C. V.; ROSS, W. F. & BLAIR, D. M. — Further observations on the macroscopic diagnosis of urinary schistosomiasis. *J. Trop. Med. Hyg.* 51: 54-59, 1948.
  20. PEDRO, R. J.; AMATO NETO, V.; FREDDI, N. A.; BERTAZZOLI, S. B. & DIAS, L. C. de — Treatment of Schistosomiasis mansoni with oxamniquine by intramuscular route: Preliminary data. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15 (Supl. 1): 63-66, 1973.
  21. PESIGAN, T. P. & YOGORE, M. G. — The relative value of the acid-ether centrifugation and Faust-Meleney egg hatching technics in the diagnosis of *S. japonica*. *Acta Med. Philipp.* 4: 69-84, 1947.
  22. PITCHFORD, R. J. & VISSER, P. S. — Some observations on the hatching pattern of *S. mansoni* eggs. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 66: 399-407, 1972.
  23. PRATA, A.; FIGUEIREDO, J. F. M.; BRANDT, P. C. & LAURIA, L. — Oxamniquine given in a single intramuscular dose for the treatment of *Schistosoma mansoni* infection. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15 (Supl. 1): 47-57, 1973.
  24. RITCHIE, L. S. & BERRIOS-DURAN, L. A. — A simple procedure for recovering schistosome eggs in mass from tissues. *J. Parasit.* 47: 363-365, 1961.
  25. SILVA, L. C. da; SETTE JR., H.; CHAMONE, D. A. F.; ALQUELAR, A. S. & MONTEIRO, A. A. — Oxamniquine (UK 4271) for the treatment of mansonian schistosomiasis in a non endemic area. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15 (Supl. 1): 58-62, 1973.
  26. STANDEN, O. D. — The effects of temperature, light and salinity upon the hatching of the ova of *S. mansoni*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 45: 225-241, 1951.
  27. SUGIURA, S.; SASAKI, T.; HOSAKA, Y. & ONO, R. — A study of several factors influencing hatching of *Schistosoma japonicum* eggs. *J. Parasit.* 40: 381-385, 1954.

Recebido para publicação em 12/7/1976.