

## ESTUDO COMPARATIVO DE DUAS TÉCNICAS PARA OBTENÇÃO DE MIRACÍDIOS DE SCHISTOSOMA MANSONI EM FEZES HUMANAS

Cecília Pereira de SOUZA (1), Marisa de Souza RODRIGUES (1), Maria de Lourdes Lima de AZEVEDO (1) e Neusa ARAUJO (2)

### RESUMO

Foi comparada a eficácia de duas técnicas para obtenção de miracídios de *Schistosoma mansoni* de ovos provenientes de fezes humanas para infecção de *Biomphalaria glabrata*. Na técnica "A" utilizou-se água desclorada a 4°C e na "B", solução salina (0,85%) e água desclorada em temperatura ambiente para suspender as fezes. Foram utilizadas 8 cepas humanas de *S. mansoni*, procedentes de cinco localidades do Estado de Minas Gerais, antes do tratamento. O número de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes variou de 360 a 2.328. As taxas de eclosão dos ovos e de infecção dos moluscos foram de 3,3% e 37,0% respectivamente, com a técnica "A" e de 6,9% e 27,0% respectivamente, com a técnica "B". Não houve diferença significativa entre a mortalidade dos moluscos nas duas técnicas. A análise dos resultados mostrou que a técnica "B" apresentou maior porcentagem de eclosão dos ovos de *S. mansoni* mas a técnica "A" apresentou melhor taxa de infecção dos moluscos.

### INTRODUÇÃO

O isolamento de cepas de *Schistosoma mansoni* para investigações diversas, tem sido bastante utilizado em pesquisa.

BASTOS & col.<sup>3</sup> isolaram duas cepas de *S. mansoni* de origem humana e silvestre do Vale do Rio Paraíba do Sul, para estudar o comportamento parasitológico das duas linhagens do trematódeo.

A resistência demonstrada por algumas cepas de *S. mansoni* aos esquistossomicidas usuais também tem motivado o seu isolamento para novos estudos em terapêutica experimental<sup>1,2,4,6,7,9,14</sup>. Os indivíduos portadores de *S. mansoni*, que foram tratados e não alcançaram a cura, normalmente apresentam um número pequeno de ovos do parasita por grama de fezes. Decorre desse fato a necessidade de se utilizar métodos bem acurados para se conseguir aproveitar o maior número possível de ovos das

fezes desses indivíduos para eclosão dos miracídios.

No presente trabalho foi feito um estudo comparativo entre duas técnicas para obtenção de miracídios de *S. mansoni* em fezes humanas com o objetivo de selecionar qual a que apresentaria maior recuperação e melhores taxas de infecção de *Biomphalaria glabrata*.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 8 cepas de *Schistosoma mansoni* provenientes de indivíduos com 360 a 2.328 ovos por grama de fezes, antes do tratamento. A maioria desse material foi conseguida através da seção de Parasitose da Prefeitura de Belo Horizonte e o restante, através do Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisas "René Rachou". Os indivíduos para-

(1) Centro de Pesquisas "René Rachou" — Fundação Oswaldo Cruz, M. S., Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

(2) Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

sitados eram procedentes de várias localidades do Estado de Minas Gerais: A.P.S. e M.G.F. de Ravena; M.A.F. de Contagem; A.M.D. de Tarumirim; G.S. de Igarapé; D.D.M., M.A.B.O. e P.P.S.F. de Belo Horizonte.

Os caramujos usados foram *Biomphalaria glabrata*, criados em laboratório e originários de exemplares coletados no Barreiro de Cima, Belo Horizonte, Minas Gerais.

No início do experimento foram retiradas amostras das fezes de cada paciente, para fazer a contagem do número de ovos de *S. mansoni* pelo método quantitativo de KATO-KATZ<sup>8</sup>. Em seguida procedeu-se a pesagem do bolo fecal, que foi dividido em duas porções de peso igual, uma para cada técnica. As duas técnicas foram testadas paralelamente. Técnica "A", padrão, foi descrita por ZICKER & col.<sup>20</sup>. As fezes foram suspensas em água desclorada em temperatura de 4°C e a suspensão foi filtrada em tela metálica e deixada em geladeira durante 30 minutos para sedimentar; decorrido esse tempo, o sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspenso em água desclorada a 4°C e novamente colocado em geladeira durante 20 minutos para sedimentar. Repetiu-se a lavagem até a suspensão ficar límpida. Depois de limpo o sedimento foi passado para placas de Petri e colocado sob lâmpada de 60 Watts para a eclosão dos ovos.

Técnica "B", baseada no método utilizado por PELLEGRINO & KATZ<sup>15</sup> para obtenção de ovos de *S. mansoni* em fígado e intestinos de camundongos ou cricetos. As fezes foram suspensas em solução salina (0,85%) em temperatura ambiente; a suspensão foi filtrada em tela metálica e deixada em câmara escura durante 30 minutos para sedimentar; em seguida o sobrenadante foi jogado fora e o sedimento foi ressuspenso em água desclorada em temperatura ambiente e colocado novamente em câmara escura durante 20 minutos para sedimentar. Repetiu-se a lavagem até a suspensão ficar límpida. Depois do sedimento limpo, procedeu-se como na técnica "A".

A água utilizada nos experimentos foi desclorada através de fervura ou destilada. A suspensão de fezes foi filtrada em tela metálica com malhas de 500 $\mu$  de diâmetro. A temperatura de eclosão dos ovos nos dois experimentos foi de 26  $\pm$  2°C. Registrou-se o tempo gasto

do início da exposição dos ovos à luz artificial até a contagem dos miracídios. Foi feita infecção em massa utilizando 20 miracídios por caramujo. Os experimentos com amostras pequenas de fezes foram repetidos.

No final do experimento, foram calculados o total de ovos de *S. mansoni*, as taxas de eclosão dos ovos, o número de miracídios por g de fezes, o total de miracídios, as taxas de infecção e mortalidade dos moluscos, com cada cepa de *S. mansoni* e esses dados foram somados e comparados nas duas técnicas. As diferenças observadas foram analisadas estatisticamente.

## RESULTADOS

Pela comparação dos dados verificou-se que, o tempo gasto para eclosão dos ovos de *S. mansoni* em todas as cepas, foi maior 2 a 4 vezes, utilizando a técnica "A". O número de miracídios eclodidos em cada cepa, na técnica "B", foi mais elevado 2 a 7 vezes. As taxas de eclosão dos ovos nas 8 cepas de *S. mansoni*, variaram de 0,3 a 11,0% na técnica "A" e de 1,3 a 15,3% na técnica "B" (Tabela I).

A porcentagem de infecção dos moluscos foi mais elevada na técnica "A" apresentando diferenças estatisticamente significativas com as cepas MGF e PPSF. A variação na taxa de infecção foi de 6,0 a 74,6% na técnica "A" de 5,0 a 40,7%, na "B" (Tabela II).

A mortalidade dos caramujos apresentou oscilações entre algumas cepas nas duas técnicas (Tabela II).

Os resultados globais, relativos a eclosão de ovos de *S. mansoni* e infecção dos caramujos, utilizando as 8 cepas do trematódeo (Tabela III), mostraram que na técnica "A", a taxa de eclosão foi de 3,3% e a infecção foi de 37,0% e na técnica "B", a eclosão foi de 6,9% e a infecção foi de 27,0%. A diferença de 10% entre as taxas de infecção nas duas técnicas, foi estatisticamente significativa. Não houve diferença significativa entre a mortalidade dos moluscos, nas duas técnicas.

## DISCUSSÃO

A eclosão de ovos de *S. mansoni* provenientes de fezes humanas foi pesquisada detalhadamente por MALDONADO & ACOSTA-MATIENZO<sup>10</sup>. Esses Autores obtiveram taxas de eclosão

SOUZA, C. P. de; RODRIGUES, M. de S.; AZEVEDO, M. de L. L. de & ARAUJO, N. — Estudo comparativo de duas técnicas para obtenção de miracídeos de *Schistosoma mansoni* em fezes humanas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 23: 251-255, 1981.

T A B E L A I

Obtenção de miracídeos de *Schistosoma mansoni* em fezes humanas utilizando duas técnicas: água a 4°C "A" e solução salina e água em temperatura ambiente "B"

Cepas de <i>S. mansoni</i>	Técnica utilizada	Total de fezes (g)	N.º de ovos por g de fezes	Total de ovos	Tempo de eclosão dos ovos (minutos)	N.º de miracídeos por g de fezes	Total de miracídeos	% de eclosão dos ovos
APS	A	133,0	1980	263.340	90	30	4.017	1,5
	B	133,0	1980	263.340	40	104	13.809	5,2
MAF	A	36,5	360	13.140	140	19	690	5,0
	B	36,5	360	13.140	60	44	1.620	12,0
MGF	A	77,0	948	72.996	107	6	5.805	8,0
	B	77,0	948	72.996	67	7	7.179	10,0
AMD	A	86,5	1080	93.420	120	3	296	0,3
	B	86,5	1080	93.420	65	14	1.202	1,3
DDM	A	83,0	1356	112.548	80	39	3.224	2,9
	B	83,0	1356	112.548	45	42	3.529	3,1
MABO	A	51,3	924	47.401	85	101	5.209	11,0
	B	51,3	924	47.401	45	141	7.263	15,3
PPSF	A	78,0	888	69.264	95	17	1.332	1,9
	B	78,0	888	69.264	20	122	9.584	13,8
GS	A	37,5	2328	87.300	55	128	4.828	5,5
	B	37,5	2328	87.300	30	216	8.110	9,3

T A B E L A II

Infecção de *Biomphalaria glabrata* com miracídeos de *Schistosoma mansoni* obtidos em fezes humanas, através de duas técnicas

Cepa de <i>S. mansoni</i>	Local de procedência	Técnica utilizada	N.º de miracídeo por molusco	N.º de moluscos expostos	% de mortalidade	% de moluscos positivos	% de infecção
APS	Ravena	A	20	192	6,3	70	36,4
		B	20	350	6,0	106	30,2
MAF	Contagem	A	20	34	26,5	15	44,1
		B	20	81	29,6	33	40,7
MGF	Ravena	A	20	217	33,2	107	49,3(*)
		B	20	226	41,2	83	36,7(*)
AMD	Tarumirim	A	20	12(**)	0,0	2	16,6
		B	20	60	16,6	5	8,3
DDM	Belo Horizonte	A	20	100	27,0	24	24,0
		B	20	100	8,0	20	20,0
MABO	Belo Horizonte	A	20	100	30,0	30	30,0
		B	20	100	20,0	23	23,0
PPSF	Belo Horizonte	A	20	67	3,0	50	74,6(*)
		B	20	100	4,0	29	29,0(*)
GS	Igarapé	A	20	100	3,0	6	6,0
		B	20	100	3,0	5	5,0

(\*) Diferenças estatisticamente significantes.

(\*\*) Amostra pequena, a diferença na taxa de infecção não foi considerada.

T A B E L A III

Resultados de experimentos utilizando fezes de 8 pacientes com esquistossomose para comparar duas técnicas para obtenção de miracídeos de *Schistosoma mansoni*

Total de ovos de <i>S. mansoni</i>	Técnica utilizada	Total de miracídeos eclodidos	Total de moluscos expostos	N.º de moluscos positivos	% de infecção	N.º de moluscos mortos	% de mortalidade
759.409	A	25.401 (3,3%)	822	304	37,0(*)	155	18,8
759.409	B	52.296 (6,9%)	1.117	304	27,0	183	16,3
1.518.818	—	77.697 (5,1%)	1.939	608	31,3	338	17,4

(\*) Diferença significativa estatisticamente

( ) Porcentagem

variando de 46,6 a 100,0% e média de 83,6% em um total de 1971 ovos de *S. mansoni* provenientes de fezes frescas de um único paciente com esquistossomose. Esses ovos foram deixados em observação em água durante alguns dias, verificando-se que 65,0% da eclosão ocorria nas primeiras 8 horas.

Nesse experimento, utilizando-se fezes de 8 pacientes a fim de testar duas técnicas para obtenção de miracídios de *S. mansoni*, obteve-se taxas de eclosão variando de 0,3 a 15,3%, porcentagem baixa em comparação com os dados de MALDONADO & ACOSTA-MATIENZO<sup>10</sup>. Isto ocorreu provavelmente devido ao período menor de observação dos ovos em água, no máximo 4 horas e ao fato das fezes não serem frescas<sup>10,11</sup>. Como não foi feito um cálculo do número de ovos de *S. mansoni* viáveis no sedimento após a lavagem tomou-se como total de ovos, o encontrado no exame de fezes (Kato-Katz). As condições ideais já preconizadas para a eclosão dos ovos de *S. mansoni* foram observadas<sup>5,12,13 16,17 19</sup>.

Quanto ao número de ovos eclodidos, na técnica "B", obteve-se duas vezes mais miracídios do que na técnica "A", mas a taxa de infecção de caramujos com esses miracídios foi menor. Esses resultados aparentemente contraditórios, devem-se provavelmente à eclosão posterior à contagem, dos ovos lavados em água gelada. Como o material ficou em contato com os moluscos durante 6 a 15 horas, sob luz artificial, houve chance de penetração dos miracídios eclodidos posteriormente. O número de caramujos expostos, aos miracídios nas duas técnicas foi diferente (menor na técnica "A"), mas o número de moluscos que eliminaram cercárias foi igual. Em relação ao tempo gasto para eclosão, observou-se que houve diferença entre as cepas de *S. mansoni* testadas e a cepa LE mantida em laboratório há mais de 15 anos<sup>18</sup>. A eclosão de ovos de *S. mansoni* provenientes de fezes humanas foi mais demorada, fato também observado por MALDONADO & col.<sup>12</sup>. Nos ovos de *S. mansoni* (LE) provenientes de fígado e intestinos de camundongos ou cricetos, a eclosão normalmente se iniciou antes de terminar a lavagem do material e alguns miracídios foram perdidos com o sobrenadante. Nos ovos de *S. mansoni* provenientes de fezes humanas observou-se que o tempo mínimo gasto para início de eclosão foi de 10

minutos, após exposição à luz (técnica "B"), com a cepa PPSF (Pampulha, Belo Horizonte). Portanto não houve perda de miracídios na lavagem.

A técnica "B" tem sido utilizada rotineiramente nesse laboratório para obtenção de miracídios em fezes humanas com número baixo de ovos por grama (até 4 ovos) e em fezes de ratos silvestres naturalmente infectados por *S. mansoni*, com resultados satisfatórios. Essa técnica apresenta as vantagens de eliminar o uso de geladeira e da eclosão se dar mais rapidamente.

A análise dos resultados, mostrou que a técnica "B" apresentou maior porcentagem de eclosão de ovos de *S. mansoni* mas a técnica "A", apresentou melhor taxa de infecção dos moluscos.

#### SUMMARY

#### Comparative study of two techniques for obtention of miracidia of *Schistosoma mansoni* from human feces

The efficiency of two techniques was compared in obtaining *S. mansoni* miracidia from human feces. Dechlorinated tap water at 4°C was used in technique "A"; saline solution (0,85%) and dechlorinated tap water at room temperature was employed in technique "B", for diluting feces. Individuals coming from 5 different regions of Minas Gerais State for drug treatment, supplied samples of feces containing 8 *S. mansoni* strains. The number of *S. mansoni* eggs/gram feces varied from 360 to 2328. The rate of eclosion of eggs and the rate of infection of snails were 3.3% and 37.0% with technique "A" and 6.9 and 27.0% with technique "B" respectively. Snail mortality was not different in the two proceedings. The results indicate that technique "B" gives higher percentage of eclosion of eggs, but technique "A" gives higher infection rates in molluscs.

#### AGRADECIMENTOS

Os Autores agradecem aos Drs. Adelú Chaves, Roberto Sena Rocha e Maria Fernanda Furtado de Lima e Costa, pela seleção de pacientes com taxa elevada de ovos de *S. mansoni* nas fezes. Ao técnico Gercy de Souza Moraes pela contagem de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes.

SOUZA, C. P. de; RODRIGUES, M. de S.; AZEVEDO, M. de L. L. de & ARAUJO, N. — Estudo comparativo de duas técnicas para obtenção de miracídeos de *Schistosoma mansoni* em fezes humanas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 23: 251-255, 1981.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAUJO, N. — Tentativa de obtenção de cepas de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, resistentes aos agentes quimioterápicos. [Tese de Mestrado]. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1978, 77 p.
2. ARAUJO, N.; KATZ, N.; DIAS, E. P. & SOUZA, C. P. — Susceptibility to chemotherapeutic agents of strains of *Schistosoma mansoni* isolated from treated and untreated patients. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 890-894, 1980.
3. BASTOS, O. C.; MAGALHÃES, L. A.; RANGEL, H. A. & PIETRABUENA, A. E. — Alguns dados sobre o comportamento parasitológico das linhagens humana e silvestre do *Schistosoma mansoni* no Vale do Rio Paraíba do Sul, SP (Brasil). *Rev. Saúde Públ. São Paulo* 12: 184-199, 1978.
4. CAMPOS, R.; MOREIRA, A. A. B.; SETTE Jr., H.; CHAMONE, D. A. & SILVA, L. C. — Hycanthon resistance in a human strain of *Schistosoma mansoni*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70: 261-262, 1976.
5. CHIEFFI, P. P.; SIQUEIRA, J. G. V. & PASCHOALOTTI, M. A. — Estudo sobre o método de eclosão de miracídeos para diagnóstico da esquistossomose mansônica, em inquéritos epidemiológicos. *Rev. Brasil. Malariol. Doenças Trop.* 30: 65-75, 1978.
6. DIAS, L. C.; PEDRO, R. J.; RIGO, E. & GOTO, M. M. F. — Linhagem humana de *Schistosoma mansoni* resistente a esquistossomicidas. XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. III Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia. Resumos dos Temas Livres, 1978, p. 146.
7. KATZ, N. — Avaliação terapêutica do Hycanthon em pacientes com período de infecção esquistossomótica conhecido. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 5: 55-60, 1971.
8. 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: 397-400, 1972.
9. KATZ, N.; DIAS, E. P.; ARAUJO, N. & SOUZA, C. P. — Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 7: 381-387, 1973.
10. MALDONADO, J. F. & ACOSTA-MATIENZO, J. — Biological studies on the miracidium of *Schistosoma mansoni*. Part I — Hatchability, longevity and infectivity of the miracidium of *Schistosoma mansoni*. *Amer. J. Trop. Med.* 28: 645-657, 1948.
11. MALDONADO, J. F.; ACOSTA-MATIENZO, J. & THILLET, C. J. — Biological studies on the miracidium of *Schistosoma mansoni*. Part 2 — Behaviour of the unhatched miracidium in undiluted stools under diverse environmental conditions. *Puerto Rico J. Publ. Health & Trop. Med.* 25: 154-169, 1949.
12. MALDONADO, J. F.; ACOSTA-MATIENZO, J. & VELLEZ-HERRERA, F. — Biological studies on the miracidium of *Schistosoma mansoni*. Part 3 — The role of light and temperature in hatching. *Puerto Rico J. Publ. Health & Trop. Med.* 25: 359-376, 1950.
13. MALDONADO, J. F.; ACOSTA-MATIENZO, J. & VELLEZ-HERRERA, F. — Biological studies on the miracidium of *Schistosoma mansoni*. Part 4 — The role of pH in hatching and longevity. *Puerto Rico J. Publ. Health & Trop. Med.* 26: 85-91, 1951.
14. YARINSKY, A. — Hycanthon resistance in a human strain of *Schistosoma mansoni*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71: 87-88, 1977.
15. PELLEGRINO, J. & KATZ, N. — Experimental chemotherapy of *Schistosomiasis mansoni*. *Adv. Parasitology* 6: 233-290, 1968.
16. PITCHFORD, R. & VISSER, P. S. — Some observations on the hatching pattern of *Schistosoma mansoni* eggs. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 66: 399-407, 1971.
17. PRAH, S. K. & JAMES, C. — The influence of physical factors on the behaviour and infectivity of miracidia of *Schistosoma mansoni* and *S. hematobium*. II — Effect of light and depth. *J. Helminth.* 52: 115-120, 1978.
18. SOUZA, C. P.; DIAS, E. P.; AZEVEDO, M. L. L. & PAULINI, E. — Observações sobre alguns fatores que influem na manutenção do *Schistosoma mansoni* em laboratório. *Rev. Brasil. Pesq. Med. Biol.* 12: 411-419, 1979.
19. 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.
20. ZICKER, F.; KATZ, N. & WOLF, J. — Avaliação do teste de eclosão de miracídeos na esquistossomose mansônica. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 19: 202-207, 1977.

Recebido para publicação em 9/10/1980.