Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Parasitologia Clínica

Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Parasitologia Clínica

Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas

Geraldo Attilio De Carli

Professor Titular de Parasitologia. Mestre em Parasitologia e Doutor em Farmácia e Bioquímica. Professor de Parasitologia Clínica, Faculdade de Farmácia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil. Ex-Professor Titular de Análises Parasitológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS (1963-1997), Porto Alegre, RS, Brasil. Ex-Professor Titular de Parasitologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS, São Leopoldo, RS, Brasil (1976-1987). Ex-Bolsista da Universidade de Wisconsin, Madison, EUA (1965-1967). Ex-Bolsista do Centro Panamericano de Zoonoses, Oficina Sanitária Panamericana (OPS/OMS), Buenos Aires, Argentina (1982). Ex-Bolsista da Japan International Cooperation Agency (JICA), Japan Association of Parasite Control (1987) e Universidade de Kyorin, Tóquio, Japão (1993). Ex-Bolsista da Comissão das Comunidades Européias (CEE), Universidade de Rouen, Rouen, França (1987-1988). Ex-Bolsista da Deutscher Akademischer Austauschdiemst (DAAD), Instituto de Medicina Tropical Bernhard Nocht, Hamburgo, Alemanha (1991)

Atheneu

São Paulo • Rio de Janeiro • Belo Horizonte

© *Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.*

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

EDITORA ATHENEU

São Paulo — *Rua Jesuíno Pascoal, 30*
Tels.: (11) 222-4199 • 220-9186
Fax: (11) 223-5513
E-mail: edathe@terra.com.br

Rio de Janeiro — *Rua Bambina, 74*
Tel.: (21) 2539-1295
Fax: (21) 2538-1284
E-mail: atheneu@atheneu.com.br

Belo Horizonte — *Rua Domingos Vieira, 319 — Conj. 1.104*

PLANEJAMENTO GRÁFICO/CAPA: Equipe Atheneu

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas / [editor] Geraldo Attilio De Carli. — São Paulo: Editora Atheneu, 2001.

Vários colaboradores.

1. Diagnóstico laboratorial 2. Doenças parasitárias 3. Parasitologia diagnóstica 4. Parasitologia médica I. De Carli, Geraldo Attilio.

CDD-616.960756
01-3246 NLM-WV 615

Índices para catálogo sistemático:

1. Parasitoses humanas: Diagnóstico laboratorial: Medicina 616.960756

DE CARLI, G.A.
Parasitologia Clínica – Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU — São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, 2001

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Colaboradores

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Adelaide José Vaz
PhD. Professora Doutora do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, USP e Professora Titular da Universidade Paulista, UNIP, São Paulo, SP.

Ana Lígia Bender
MSc. Professora Assistente do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, RS.

Carlos Graeff-Teixeira
PhD. Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, RS.

Cor Jésus Fernandes Fontes
PhD. Professor Assistente em Clínica Médica do Hospital Universitário Júlio Müller da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal do Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, MT.

Hércules Moura
PhD. Pesquisador Associado da Division of Parasitic Diseases MS F13 do National Center for Infectious Diseases do Centers for Disease Control and Prevention, CDC, Atlanta, Georgia, EUA. Professor Adjunto da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Rio de Janeiro, RJ.

Edmundo Carlos Grisard
PhD. Professor Adjunto do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC.

Emílio Antonio Jeckel Neto
PhD. Professor Adjunto do Laboratório de Biologia do Envelhecimento, Instituto de Geriatria e Gerontologia e Departamento de Ciências Morfológicas, da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, RS.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Gerusa Dreyer
PhD. Professora Adjunta de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco,UFPE. Pesquisadora Titular do CPqAM-FIOCRUZ. Consultora da Organização Mundial de Saúde, OMS, para Filariose.

Luiz Carlos Severo
PhD. Professor Titular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS.

Marco Mastroeni
MSc. Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), Faculdade de Farmácia, Joinvile, SC. Doutorando em Saúde Pública, Universidade de São Paulo (USP), SP.

Maria Anete Lallo
PhD. Professora Titular da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Paulista, UNIP e da Universidade Bandeirante, São Paulo, SP.

Marilise Brittes Rott
PhD. Professora Adjunta. Instituto Básico da Saúde. Setor de Parasitologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS.

Mário Steindel
PhD. Professor Adjunto do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC. Pesquisador do CNPq.

Marisa Porta Miche Hirschfeld
PhD. Professora Doutora do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP.

Osmar Luiz M. de Oliveira
MSc. Professor Assistente da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS.

Patrícia Dreyer
Doutoranda. Acadêmica de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE. Estagiária do Núcleo de Ensino, Pesquisa e Assistência em Filariose, NEPAF-UFPE, Recife, PE.

Philippe Brasseur
PhD. Professor Titular da Faculté Mixte de Medicine et de Pharmacie de Rouen e do Departamento de Parasitologia do Hôpital Charles Nicolle, Centre Hospitalier Universitaire, CHU, Rouen, França.

Silvana de Almeida
Mestranda. Farmacêutica Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Departamento de Genética do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Suzana Bencke Amato
PhD. Professora Titular do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS.

Tiana Tasca
MSc. Farmacêutica Bioquímica e Pesquisadora do Laboratório de Protozoologia, Disciplina de Parasitologia Clínica, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, RS.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Prefácio

A Parasitologia Clínica sofreu um acréscimo de informações desde a publicação de meu primeiro livro — *Diagnóstico Laboratorial das Parasitoses Humanas. Métodos e Técnicas*.

Na preparação deste novo livro — *Parasitologia Clínica* — foi realizada uma grande e sólida revisão de novos conteúdos com o auxílio de publicações relacionadas com a Parasitologia Clínica.

Um diagnóstico clínico acurado das infecções parasitárias humanas, além de difícil, não permite uma diferenciação específica do agente infeccioso e depende da confirmação laboratorial. Para os parasitos intestinais e do sangue a demonstração morfológica do(s) estágio(s) de diagnóstico é o principal meio para estabelecer uma diagnose diferencial e definitiva. Entretanto, para as infecções dos tecidos o diagnóstico não-morfológico (sorologia) é o mais importante, incluindo a triquinelose, a hidatidose, a cisticercose, a toxocaríase, a esquistossomose crônica por *Schistosoma mansoni*, a amebíase extra-intestinal, a toxoplasmose, a tripanossomíase americana e a leishmaniose visceral ou calazar.

Um diagnóstico incorreto resulta de dois tipos de erros: de procedimento e de interpretação. Os erros de procedimento são uma conseqüência do uso incorreto do microscópio, de esfregaços impropriamente preparados, de deficiências no exame de toda a preparação, de uma observação muito rápida das preparações, de falhas no uso dos aparelhos de medida, de uma variedade de técnicas ou de boas técnicas e da falta de experiência para uma pesquisa criteriosa de certas espécies. Os erros de interpretação se devem à falta de conhecimento das várias espécies e dos diferentes tipos de artefatos presentes nas fezes; incapacidade para observar que os organismos de certas espécies apresentam uma variedade de características e que muitas vezes não se assemelham às figuras e fotografias de atlas, ou desconhecimento do fato de que os parasitos com diagnóstico duvidoso deverão ser estudados até a sua identificação, ou encaminhados a um especialista, ou, ainda, a necessidade de amostra adicional do paciente.

A Parasitologia Clínica estuda os organismos que parasitam o homem. Os organismos referidos como parasitos são um grupo heterogêneo que varia em tamanho, desde os pequenos microsporídios até os complexos organismos multicelulares, como a *Taenia saginata*.

As infecções parasitárias são encontradas em todas as áreas geográficas do mundo e inúmeras doenças, como a toxoplasmose e a larva *migrans* visceral, são

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

comuns nos países temperados. O crescimento do número de viajantes individuais pelo mundo quebrou a barreira de tempo colocada entre os países desenvolvidos e os em desenvolvimento. O aumento do número de viagens realizadas aos países tropicais disseminou as infecções, as quais no passado recente eram caracterizadas como doenças exóticas comuns. Existe, em conseqüência disso, a necessidade imediata de um correto e preciso diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas.

Este livro foi escrito para os parasitologistas, os profissionais das áreas da Saúde e das Análises Clínicas e, principalmente, os estudantes que buscam conhecer os elementos básicos do diagnóstico microscópico e que necessitam adquirir experiência nos procedimentos de laboratório voltados à pesquisa e as suas aplicações na Parasitologia.

O meu primeiro livro teve como principal objetivo reunir os métodos e técnicas indicados para o diagnóstico de laboratório das Parasitoses Humanas. As principais modificações nesta edição foram a inclusão de colaboradores e o acréscimo de novos capítulos relacionados com os Protozoários Emergentes e Oportunistas, Amebas de Vida Livre, Parasitos do Sangue e dos Tecidos, Controle de Qualidade, Biossegurança em Laboratório de Parasitologia, Imunodiagnóstico, Biologia Molecular e Técnicas Histológicas. No Capítulo Diagnóstico e Identificação dos Parasitos, foram descritos os principais parasitos com a inclusão de um pequeno atlas com fotografias, ilustrações e gráficos. Esses novos capítulos trouxeram um novo rumo para o conhecimento, a identificação e o diagnóstico das infecções parasitárias, além da inclusão de um apêndice, que irá dirigir o leitor para o estudo da Parasitologia através da Internet. Os novos capítulos, como Controle de Qualidade e Biossegurança em Laboratório de Parasitologia, foram escritos para mostrar a importância e a obrigatoriedade de seguir regras rígidas nos diferentes procedimentos de diagnóstico. Nesta edição, segui, em parte, a orientação do Dicionário de Termos Técnicos de Medicina e Saúde, escrito pelo Professor Luís Rey, como um sinalizador na normatização da maioria dos termos específicos usados.

Seis anos depois do lançamento do *Diagnóstico Laboratorial das Parasitoses Humanas — Métodos e Técnicas*, inúmeros colegas pediram-me para combinar o texto com um atlas. Apesar de meu maior esforço ter sido o da revisão e atualização de novos procedimentos para o diagnóstico de laboratório das doenças parasitárias, incluí neste livro uma série de excelentes fotografias, recebidas de amigos e de instituições, para a ilustração dos textos. A participação de novos colaboradores trouxe a esta publicação sua maturidade, pois novos capítulos foram escritos e novos procedimentos apresentados. O entusiasmo de meus colegas, que ensinam a Parasitologia Clínica, em diferentes universidades, foi uma permanente fonte de inspiração para a inclusão de um grande número de novos procedimentos de laboratório.

Freqüentemente, são sugeridos nomes comerciais de equipamentos e produtos, os quais não significam adoção ou exclusão de outros. Se houve alguma omissão, não deve ser considerada intencional.

Porto Alegre, inverno de 2001

Geraldo Attilio De Carli

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Agradecimentos e Créditos

Os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram de diferentes maneiras para a realização deste livro. Eu sou reconhecido pela participação efetiva do Professor Hércules Moura, PhD, Pesquisador Visitante da *Division of Parasitic Diseases MS F13, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), Atlanta, Geórgia, EUA, pelas sugestões e co-autoria de vários capítulos. A Phuc Nguyen-Dinh, PhD, do *CDC DPDx Network Group*, Atlanta, Geórgia, EUA, pela autorização da inclusão das fotogravuras coloridas do *DPDx, the CDC Website for Parasitology Diagnosis, EUA*. A Denis Lemeteil, PhD da Faculté Mixte de Medicine et de Pharmacie de Rouen, Rouen, França. À Professora Lenilza Mattos de Lima, MSc, do Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, e à Professora Regina Maura Bueno Franco, PhD, do Departamento de Parasitologia, IB-UNICAMP, Campinas, SP, pelas fotografias. Sou profundamente agradecido ao Professor José Fernando Fagundes de Azevedo e Cristiano Max Pereira Pinheiro da AGEXPP (PUCRS), aos fotógrafos Marcos Colombo e Gilson José de Oliveira, e a Marco Fiori pela digitalização das imagens. Agradeço à senhora Lúcia Barreiros, da Produção Editorial da Editora Atheneu, pela participação efetiva na concretização desta obra.

As microfotografias e os desenhos incluídos neste livro foram copiados e adaptados dos seguintes autores e instituições: Melvin DM, Brooke MM. **Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites**. 3rd ed. HHS publication N.º (CDC)82-8282. Atlanta: Laboratory Training and Consultation Division, Centers for Disease Control, 1982 (Figs. 2.1, 2.6, 2.9, 4.4, 5.1). Markell EK, Voge M, John DT. **Medical Parasitology**. 7th ed. Philadelphia (Pa): WB Saunders Co,1992 (Figs. 2.8, 3.2, 6.5, 12.1, 12.2). Ash LR, Oriehl TC. **Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification**. Chicago (Ill): ASCP Press,1991 (Figs. 2.11, 8.1). **DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis**. USA (Figs. 10.2, 10.7, 10.9, 10.10, 11.1-11.3, 16.1, 38.1, 38.2, 38.4, 38.5, 38.7, 38.8, 38.9, 39.10, 38.11, 38.12, 38.13, 38.14, 38.15, 38.16, 38.17, 38.19, 38.24, 38.25, 38.28, 38.29, 38.30, 38.32AB, 38.34B, 38.35, 38.36, 38.37, 38.38, 38.39, 38.40, 38.41). Rey L. **Parasitologia**. 2.ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1991 (Figs. 4.2, 4.3). Pessôa SB, Martins AV. **Pessôa Parasitologia Médica**. 11.ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1982. (Figs. 4.1, 4.3, 6.3). **Division of Communicable Diseases**, WHO, Genebra (Fig. 5.3). Faust EC,

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Beaver PC, Jung RC. **Animal Agents and Vectors of Human Disease**. 3.ª ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1968 (Fig. 6.1). Craig CF, Faust ECF. **Clinical Parasitology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1970 (Fig. 19.7). Centers for Disease Control and Prevention — National Institutes of Health (Figs. 34.1, 34.2, 34.3). Brumpt E, Neveu-Lemaire N. **Travaux Pratiques de Parasitology**. Paris: Masson et Cie Editeurs, 1958 (Fig. 36.1). Dobell C, O'Connor FW. **The Intestinal Protozoa of Man**. London: John Bale Sons & Danielsson, 1921 (Fig. 38.6). Mehlhorn H. editor. **Parasitology in Focus**. Berlin: Springer-Verlag, 1988 (Fig. 38.18). National Institutes of Health, USPHS, USA (Figs. 38.20, 38.21, 38.22, 38.23). Spencer FM, Monroe LS. **The Color Atlas of Intestinal Parasites**. Springfield (III): Charles C. Thomas, Publisher, 1968 (Figs. 38.26, 38.27, 38.31). Suzuki N. **Human Helminth Eggs**. Tokyo: JAPC e JOICFP, 1981 (Figs. 6.4, 38.32CD, 38.42). Gradwohl RBH, Kouri P. **Clinical Laboratory Methods and Diagnosis — Parasitology and Tropical Medicine**. 4th ed. St. Louis: CV Mosby Co, 1948 (Fig. 6.2). Gardiner et al. **An Atlas of Protozoa Parasites in Animal Tissues**. USDA, Agriculture Handbook n.º 651; 1988 [on line). Disponível em URL: http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasit (1999, Set 3) (Fig. 10.3). **Laboratory Diagnosis of Parasitic Diseases**. Emory Medical School Course and Laboratory Training Unit Laboratory Consultation and Developed Branch, CDC, Atlanta, Geórgia, USA, 1966 (Fig. 12.3). **Leica Aotec** (Figs. 31.1, 31.2, 31.3, 31.4, 31.5). Burke JA. The clinical and laboratory diagnosis of giardiasis. **CRC Cr Rev Clin Lab Sci** 1977;7:373-391 (Fig. 8.2). Moura RADA. **Colheita de Material para Exame de Laboratório. Assegurando a Qualidade dos Serviços no Laboratório Clínico**. São Paulo: Editora Atheneu; 1998 (Fig. 8.4). Barreto MP, Zago Filho H. Comportamento de "*Trichomonas vaginalis*" Donné, 1837 e de "*Trichomonas tenax*" (O.F. Müller, 1773) em meio de cultura viscoso. **Rev Brasil Biol** 1957;17:501-508 (Fig. 25.1). Biomed Diagnostic, 1743, Hudson Dr., São José, Ca, EUA (Fig. 25.2). Olympus Optical Co., Ltd., Tóquio, Japão (Fig. 33.1). Lushbaugh B. **Coccidia & Microsporidia** [on line]. Disponível em <URL: http://fiona.umsmed.edu> (1999, Jun 27) (Fig. 38.3). Pappas PW, Wardrop SM e Oklahoma State University, College of Veterinary Medicine. ***Trichomonas vaginalis*** [on line]. Disponível em <URL: http://calvin.biosci.ohio-state-edu/~zoology> [1997, Jan 24] (Fig. 8.6). Collins R. Protozoan parasites of the intestinal tract: A review of coccidia and microsporidia. **JAOA** 1997;10:593-598 (Fig. 10.1). Schell SC. Parasitology manual. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1962 (Fig. 2.4). Neto Amato V, Campos R. Diagnóstico das Parasitoses Intestinais pelo Exame das Fezes. São Paulo: Livraria Editora Artes Médicas Ltda; 1968 (Fig. 38.33), Department of the Army, USA; 1961 (Fig. 38.34A). As outras microfotografias e desenhos foram entregues pelos autores dos diferentes capítulos. À Tiana Tasca, MSc, farmacêutica bioquímica e pesquisadora, que, com segurança e dedicação, revisou os originais. Ao Professor Sérgio De Meda Lamb, Diretor da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), pelo apoio e incentivo. Eu sou extremamente grato a minha esposa Mirian e a minha filha Cristina, pela compreensão, alento e assistência, durante os longos meses nos quais esse livro foi submetido a intermináveis revisões.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Sumário

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

SEÇÃO 1 — PARASITOS INTESTINAIS, 1

1. Colheita e Preservação da Amostra Fecal, 3
Geraldo Attilio De Carli

Considerações Gerais, 3
Colheita, 4
Fezes Emitidas Espontaneamente
Amostras Múltiplas, 5
Fezes Emitidas com o Uso de Laxantes, 7
Estabilidade das Amostras, 7
Preservação da Amostra Fecal, 7
Solução de Formaldeído
Fixador de Schaudinn
Fixador de Schaudinn Modificado
Fixador Álcool Polivinílico (Fixador APV)
Fixador Álcool Polivinílico Modificado
Fixador Mertiolato-Iodo-Formaldeído (MIF)
Fixador Acetato de Sódio-Ácido Acético-Formaldeído (SAF)
Controle de Qualidade dos Preservadores, 21
Fixador Fenol-Álcool-Formaldeído (PAF)
Albumina Fixadora de Mayer

2. Exames Macroscópico e Microscópico da Amostra Fecal Fresca e Preservada, 27
Geraldo Attilio De Carli

Considerações Gerais, 27
Exame Macroscópico, 28
Simples Observação
Tamisação
Identificação de Proglotes de *Taenia* spp., 29
Método do Ácido Acético Glacial
Método de Campos

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Método da Tinta da China
Exame Microscópico, 33
Exame Direto a Fresco
Preparações Salinas
Colorações Temporárias, 37
Soluções de Iodo, 38
Solução de Iodo de Lugol
Solução de Iodo de Dobell e O'Connor
Solução de Iodo de D'Antoni Modificada
Solução de Quensel, 41
Solução Tamponada de Azul-de-Metileno de Nair, 43
Solução de Mertiolato-Iodo-Formaldeído (MIF), 46
Exame Direto para a Pesquisa de Ovos de Helmintos, 47
Método do Esfregaço Espesso de Celofane
Técnicas de Concentração, 49
Técnicas de Flutuação
Flutuação em Solução Saturada de Cloreto de Sódio
Flutuação em Solução de Sulfato de Zinco
Flutuação em Solução de Sulfato de Magnésio
Centrífugo-Flutuação em Sulfato de Zinco
Técnicas de Sedimentação
Sedimentação Espontânea
Centrífugo-Sedimentação pela Formalina-Éter ou
Centrífugo-Sedimentação pela Formalina-Acetato de Etila
Centrífugo-Sedimentação pelo Sulfato de Sódio-Ácido Clorídrico-Triton-Éter (AMSIII)
Centrífugo-Sedimentação pelo Acetato de Sódio-Ácido Acético
Corante Iodo-Tricrômico para Sedimento
Técnicas de Concentração Específicas para Coccídios, 72
Centrífugo-Flutuação em Solução de Sacarose
Centrífugo-Sedimentação pelo Formaldeído-Éter Modificado
Centrífugo-Sedimentação pelo Hidróxido de Potássio

3. Preparação e Coloração de Esfregaços Permanentes, 83
Geraldo Attilio De Carli

Considerações Gerais, 83
Colorações Derivadas da Hematoxilina, 84
Coloração pela Hematoxilina Férrica, Segundo Heidenhain, Modificada por Burrows
Coloração pela Hematoxilina Férrica, Segundo Heidenhain, Modificada por Melvin e Brooke (FNP)
Coloração pela Hematoxilina Férrica, Segundo Heidenhain, Modificada por Melvin e Brooke (FP)
Coloração pela Hematoxilina Férrica-Ácido Fosfotúngstico
Coloração pela Hematoxilina Férrica-Ácido Clorídrico
Colorações pelo Tricrômico, 100
Método de Wheatley

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Método de Brooke
Método de Yang e Scholten
Outros Métodos de Coloração, 107
Coloração pela Tionina
Solução de Fenol de Kohn
Coloração pelo Corante *Clorazol Black* E
Coloração pelo Corante *Polychrome* IV

4. Isolamento e Cultura de Larvas de Nematóides, 115
Geraldo Attilio De Carli

Considerações Gerais, 115
Método de Baermann-Moraes
Método de Rugai, Mattos e Brisola
Cultura no Papel-Filtro em Tubo de Ensaio
Cultura no Papel-Filtro em Placa de Petri
Cultura de Larvas em Carvão
Cultura de Larvas de *Strongyloides stercoralis* em Placa de Ágar

5. Demonstração e Quantificação de Ovos na Fezes, 129
Geraldo Attilio De Carli

Considerações Gerais, 129
Método de Stoll e Hausheer
Método de Stoll Modificado
Métodos Coprológicos Quantitativos Específicos para o Diagnóstico do *Schistosoma mansoni*
Método de Bell
Método de Barbosa
Método de Kato-Katz
Método de Teesdale e Amin

6. Artefatos que Podem Ser Confundidos com Organismos Parasitos, 141
Geraldo Attilio De Carli

Considerações Gerais, 141
Elementos em Trânsito
Elementos Derivados de Contaminação Externa

7. Expressão dos Resultados no Exame Parasitológico das Fezes, 155
Geraldo Attilio De Carli

Considerações Gerais, 155
Expressão dos Resultados
Anexo, 159
Parasitos do Sangue, do Trato Geniturinário e Exame Cultural de Protozoários

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

SEÇÃO 2 — EXAME DE ASPIRADOS, DOS TECIDOS, DA URINA, DAS SECREÇÕES E DE MATERIAL DE BIÓPSIA, 163

8. Exame de Outros Espécimes do Trato Intestinal e Sistema Urogenital, 165
Geraldo Attilio De Carli

Considerações Gerais, 165
Pesquisa de *Enterobius vermicularis*, 165
Método da Fita de Celofane Adesiva e Transparente
Método do *Swab* de Vaselina e Parafina (VASPAR)
Aspirado Duodenal, 170
Método da Cápsula Duodenal (*Entero Test*®)
Sigmoidoscopia, 174
Material de Sigmoidoscopia: Exame Direto a Fresco
Material de Sigmoidoscopia: Esfregaços Permanentes Corados
Endoscopia, 178
Sistema Urogenital, 178
Técnica da Tríplice Concentração da Urina
Técnica da Urina Concentrada pela Centrifugação
Técnica da Urina Concentrada pela Membrana Filtrante (*Nuclepore*)
Pesquisa de *Trichomonas vaginalis*, 184
Amostra
Colheita da Amostra
Preservação da Amostra
Exame Microscópico, 190
Exame Direto a Fresco
Preparações Coradas
Corante — *Vaginal Identification of Pathogens* (VIP)
Coloração pela Solução de Iodo de D'Antoni
Coloração de Giemsa
Exame das Culturas, 198
Imunodiagnóstico, 199

9. Escarro, Aspirados, Material de Biópsia e Exame dos Tecidos, 207
Geraldo Attilio De Carli

Considerações Gerais, 207
Escarro, 207
Escarro Expectorado: Exame Direto a Fresco e Preparações Permanentes Coradas
Aspirados, 211
Exame dos Tecidos, 215
Pele
Método do Fragmento Superficial da Pele (Retalho Cutâneo)
Tecidos Muscular e Subcutâneo
Reto e Bexiga
Raspados e Material de Biópsia Córnea

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

SEÇÃO 3 — PARASITOS EMERGENTES E OPORTUNISTAS, 221

10. Métodos de Coloração para Coccídios Intestinais, 223
Geraldo Attilio De Carli
Hércules Moura

Considerações Gerais, 223
Cryptosporidium parvum
Cyclospora cayetanensis
Isospora belli
Métodos de Coloração, 229
Método de Henriksen-Pohlenz
Método Modificado de Kinyoun (a Frio)
Método Modificado de Ziehl-Neelsen (a Quente)
Método Modificado da Safranina (a Quente)
Método Modificado de Ziehl-Neelsen-Dimetilsulfóxido (DMSO)
Método de Heine
Coloração Negativa pela Fucsina-Fenicada
Método Rápido da Safranina
Método Modificado da Safranina (Forno de Microondas)
Coloração pela Hematoxilina Férrica Modificada
Anexo, 255
Método Modificado de Kinyoun (a Frio)
Coloração de Giemsa

11. Métodos de Coloração para Microsporídios Intestinais, 265
Geraldo Attilio De Carli
Hércules Moura

Considerações Gerais, 265
Coloração pelo *Chromotrope* (Tricrômico Modificado) (Weber-verde)
Coloração pelo *Chromotrope* ou Modificação de Ryan (Ryan-azul)
Coloração pelo *Chromotrope* a Quente ou Modificação de Kokoskin (a Quente)
Coloração de *Gram-Chromotrope* para Microsporídios
Coloração Rápida a Quente pelo *Gram-Chromotrope*
Coloração pelo *Chromotrope*

SEÇÃO 4 — PARASITOS DO SANGUE E DOS TECIDOS, 289

12. Exame do Sangue, 291
Geraldo Attilio De Carli

Considerações Gerais, 291
Preparação dos Esfregaços Sangüíneos, 292
Esfregaços Estirados
Esfregaços Espessos (Gota Espessa)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Combinação de Esfregaços Estirados e Espessos
Coloração dos Esfregaços Sangüíneos, 296
Coloração de Giemsa
Coloração de Field
Coloração de Leishman
Coloração de Wright
Concentração do Sangue, 305
Centrifugação do Sangue (Creme Leucocitário)
Método da Centrifugação Tríplice
Técnica das Fito-Hemaglutininas
Centrifugação do Micro-Hematócrito
Técnicas da Diferença de Gravidade
Método da Membrana Filtrante

13. *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, 313
Mário Steindel
Edmundo Carlos Grisard

Considerações Gerais, 313
Métodos Parasitológicos, 314
Métodos Diretos
Métodos Indiretos
Métodos Sorológicos
Métodos Moleculares

14. Leishmanioses, 325
Mário Steindel
Edmundo Carlos Grisard

Considerações Gerais, 325
Métodos Parasitológicos, 326
Leishmaniose Visceral, 328
Métodos Imunológicos
Métodos Moleculares

15. *Plasmodium* spp., 333
Cor Jesus Fernandes Fontes

Considerações Gerais, 333
Patogenia, 333
Destruição dos Eritrócitos Parasitados
Toxicidade Resultante da Liberação de Citocinas
Seqüestro dos Eritrócitos Parasitados na Rede Capilar
Lesão Capilar por Deposição de Imunocomplexos
Quadro Clínico, 334
Epidemiologia, 335
Imunidade, 335
Morfologia, 336
Diagnóstico de Laboratório, 339

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esfregaço Espesso ou Esfregaço Estirado
QBC® (Q*uantitative Buffy Coat*)

ParaSight-F® e ICT Malaria *PF*®
ICT Malaria PF/Pv® e OpitMAL®

16. Babesiose Humana, 345
Philippe Brasseur

Considerações Gerais, 345
Métodos Parasitológicos, 345
Exame Microscópico
Imunodiagnóstico, 347
Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)
Métodos Moleculares, 348
Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)
Inoculação em Animais, 348
Outros Resultados de Laboratório, 349
Conclusões, 349

17. Angiostrongilíase Abdominal, 351
Carlos Graeff-Teixeira

Considerações Gerais, 351
Diagnóstico de Laboratório, 352
Exame Anatomopatológico
Imunodiagnóstico
Métodos Moleculares
Exame Parasitológico das Fezes

18. Filarioses, 355
Geraldo Attilio De Carli
Tiana Tasca

Considerações Gerais, 355
Diagnóstico (Laboratorial) da Filariose, 356
Filariose pela *Wuchereria bancrofti*, 356
Filariose pela *Mansonella ozzardi*, 356
Filariose pela *Onchocerca volvulus*, 357
Exame a Fresco do Sangue, 357
Esfregaços Sangüíneos Espessos e Corados
Método da Contagem em Câmara
Métodos de Coloração, 359
Coloração de Giemsa
Coloração pela Hematoxilina de Delafield
Coloração pela Hematoxilina de Harris, segundo Mallory
Coloração pela Hematoxilina de Mayer
Coloração pela Hematoxilina de Bohmer

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Coloração pela Hematoxilina de Carrazzi
Métodos e Técnicas de Concentração, 367
Técnica de Knott

Método da Membrana-Filtrante
Biópsia Cutânea

19. Diagnóstico Laboratorial da Filariose Bancroftiana, 373
Gerusa Dreyer
Patrícia Dreyer

Considerações Gerais, 373
Epidemiologia, 373
Considerações Clínicas, 373
Diagnóstico de Laboratório, 373
Pesquisa de Microfilária
Pesquisa de Verme Adulto
Diagnóstico Sorológico
Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)
Outros Exames Complementares

SEÇÃO 5 — CULTIVO DE PROTOZOÁRIOS, 395

20. *Entamoeba histolytica*, 397
Geraldo Attilio De Carli

Considerações Gerais, 397
Meio *Trypticase-Yeast Extract-Iron-Serum* (TYI-S-33)
Meio *Trypticase-Yeast Extract-Gastric Mucin* (TYSGM-9)
Meio de Balamuth
Meio de Boeck and Drbohlav *Locke-Egg-Serum* (LES)
Meio de Robinson

21. Amebas de Vida Livre, 417
Geraldo Attilio De Carli
Hércules Moura

Considerações Gerais, 417
Amostras, 418
Cultura em Placa de Ágar
Meio Proteose Peptona-Extrato de Levedo-Glicose (PYG) para *Acanthamoeba* spp., pH 6,5 ± 0,2
Meio Modificado de Nelson para *Naegleria fowleri*
Exflagelação dos Organismos

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

22. *Giardia lamblia*, 429
Geraldo Attilio De Carli

Considerações Gerais, 429
Meio *Trypticase-Yeast Extract-Iron-Serum* (TYI-S-33) Modificado (*Biosate-Iron-Serum*) (BI-S-33).
Meio de Keister Modificação do Meio *Trypticase-Yeast Extract-Iron-Serum* (TYI-S-33)

23. *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* e *Leishmania* spp, 435
Mário Steindel
Edmundo Carlos Grisard

Considerações Gerais, 435
Cepas-Padrão, 436
Reagentes, 436
Meios de Cultura, 437
Meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT)
Meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN)
Meio *Brain Heart Infusion* (BHI)
Meio de Schneider (*Schneider's Insect Medium*)
Meio *Triatomine Artificial Urine* (TAU)

24. *Plasmodium falciparum*, 447
Cor Jesus Fernandes Fontes

Considerações Gerais, 447
Meio de Cultura de Trager e Jensen (RPMI 1640)
Criopreservação de Cepas de *Plasmodium falciparum*, 450

25. *Trichomonas vaginalis*, 453
Geraldo Attilio De Carli
Tiana Tasca

Considerações Gerais, 453
Meios de Cultura, 454
Meio *Trypticase-Yeast Extract-Maltose* (TYM)
Meio *Trypticase-Yeast Extract-Maltose* (TYM) Modificado por Klass
Meio *Trypticase-Yeast Extract-Maltose* (TYM) Modificado por Kulda e Hollander
Meio *Simplified-Trypticase-Serum* (STS)
Meio *Cysteine-Peptone-Liver-Maltose* (CPLM)
Meio de Feinberg e Whittington (FW)
Meio *Cysteine-Tryptose-Liver-Maltose* (CTLM), *American Type Culture Collection* (ATTC) N.º 745
Meio Semi-Sólido de Lowe para Diagnóstico e Transporte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Meio *Connaught Medical Research Laboratory* 1066 (CMRL Modificado)
Procedimentos de Inoculação em Meios de Cultura
InPouch TV™
Criopreservação, 467

26. *Trichomonas tenax* e *Trichomonas hominis*, 473
Geraldo Attilio De Carli
Tiana Tasca

Considerações Gerais, 473
Trichomonas tenax, 474
Meio TTYS-CEEC$_{25}$ (*Tryptose-Trypticase-Yeast Extract-Serum Chick Embryo Extract, Crude* 25%)
Técnica de Isolamento
Trichomonas hominis, 477

27. Microsporídios, 479
Marisa Porta Miche Hirschfeld
Maria Anete Lallo

Considerações Gerais, 479
Cultivo de Microsporídios em Culturas Celulares, 481
Cultura de Células
Processamento das Amostras Biológicas e Inoculação nas Culturas Celulares
Metodologia das Culturas Celulares Inoculadas
Concentração e Purificação de Esporos, 485
Armazenamento e Transporte das Amostras, 486
Criopreservação, 486

SEÇÃO 6 — IMUNODIAGNÓSTICO, 491

28. Testes Sorológicos ou Imunoensaios, 493
Ana Lígia Bender

Considerações Gerais, 493
Reações de Precipitação, 493
Reações de Aglutinação, 496
Ensaios Líticos, 498
Ensaios com Marcadores Fluorescentes, 498
Ensaios de Imunohistoquímica, 500
Ensaios com Marcadores Radioativos, 501
Ensaio de Quimioluminescência (QL), 501
Ensaios com Marcadores Enzimáticos, 501
Técnicas de Imunoeletrotransferência, 503

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

29. Diagnóstico Imunológico das Parasitoses, 505
Adelaide José Vaz

Considerações Gerais, 505
Imunologia das Parasitoses, 505
Fenômenos Imunológicos, 506
Modelos de Estudo, 507
Diagnóstico das Parasitoses, 507
Métodos Diretos
Biologia Molecular Aplicada às Infecções Parasitárias
Métodos Indiretos
Reação Cruzada e Reação Inespecífica, 509
Antígenos, 509
Imunoglobulinas/Anticorpos, 510
Testes Imunológicos, 511
Princípio de Alguns Testes Imunológicos, 511
Precipitação
Aglutinação
Reação de Fixação do Complemento
Métodos Utilizando Ligantes, 514
Imunofluorescência
Imunoenzimáticos
Western ou *Imunoblot*
Radioimunoensaio (RIE), Quimioluminescência e Outros
Parâmetros dos Testes Imunológicos, 517
Simplicidade e Custo dos Testes Imumológicos, 518
Testes Imunológicos nas Infecções Parasitárias, 518
Teste de Hipersensibilidade Imediata, 520
Teste de Hipersensibilidade Tardia, 520
Outros Testes de Imunidade Celular, 521
Marcadores Imunológicos no Diagnóstico de Algumas Infecções Parasitárias, 521
Protozoários
Helmintos

SEÇÃO 7 — BIOLOGIA MOLECULAR, 541

30. Métodos Moleculares no Diagnóstico das Parasitoses Humanas, 543
Edmundo Carlos Grisard
Mário Steindel

Considerações Gerais, 543
Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), 544
Extração de DNA
Dosagem de DNA
Iniciadores
Deoxinucleotídeos Trifosfatados
Tampão

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Taq DNA Polimerase
Termocicladores
Reação
Visualização dos Resultados, 549
Aplicações Práticas, 550
Genes de Interesse, 552
Cuidados com as Contaminações, 552
Considerações Finais, 552

SEÇÃO 8 — IDENTIFICAÇÃO HISTOLÓGICA, 557

31. Técnicas de Rotina em Histologia, 559
Emílio Antonio Jeckel-Neto

Considerações Gerais, 559
Fixação, 560
Tipos de Fixação
Fixadores, 561
Soluções Fixadoras de Rotina
Processamento de Tecidos, 562
Congelação, 563
Inclusão em Meio Sólido, 564
Cortes, 567
Coloração, 570
Corantes
Montagem, 572
Recomendações Gerais, 573

SEÇÃO 9 — CONTROLE DE QUALIDADE E BIOSSEGURANÇA, 575

32. Controle de Qualidade em Parasitologia Clínica, 577
Geraldo Attilio De Carli
Osmar Luiz M. de Oliveira

Considerações Gerais, 577
Garantia de Qualidade
Controle de Qualidade Interno
Controle de Qualidade Externo
Material de Referência
Manual de Procedimentos
Qualificação do Pessoal Técnico
Equipamento
Morfometria Feita com Micrômetro Ocular
Protozoários e Helmintos Intestinais, 584
Colheita da Amostra Fecal

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Solução Salina
Reagentes, Corantes e Outras Soluções
Exame Direto a Fresco
Preservadores
Colorações Temporárias
Colorações Permanentes
Colorações Específicas para Coccídios
Colorações Específicas para Microsporídios
Técnicas de Concentração
Isolamento e Cultura de Larvas de Nematóides
Pesquisa de *Enterobius vermicularis*
Método da Cápsula Duodenal (*Entero Test*®)
Parasitos do Sangue e dos Tecidos, 595
Esfregaços Estirado e Espesso
Coloração de Esfregaços Sangüíneos
Técnica de Knott
Método da Membrana Filtrante
Exame de Outros Espécimes do Trato Intestinal e Sistema Urogenital, 598
Material de Sigmoidoscopia
Pesquisa de *Trichomonas vaginalis*
Escarro
Cultivo de Protozoários, 601
Trichomonas vaginalis
Entamoeba histolytica
Leishmania spp. e *Trypanosoma* (S) *cruzi*
Coleção de Parasitos de Referência, 603
Parasitos da *American Type Culture Collection* (ATCC) para Controle de Qualidade, 604

33. Manutenção de Instrumentos e Controle de Qualidade, 611
Tiana Tasca
Silvana de Almeida

Considerações Gerais, 611
Autoclave
Banho de Água
Balança
Capelas de Segurança Biológica
Centrífuga
Geladeira
Freezer
Estufas Microbiológicas
Estufas de Esterilização
Microscópio Óptico
Termômetros

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

34. Biossegurança em Laboratório de Parasitologia, 623
Marco Mastroeni

Considerações Gerais, 623
Biossegurança: Conceito e Importância, 624
Níveis de Biossegurança, 625
Laboratórios Clínicos, 626
Equipamentos de Proteção, 626
Capelas de Segurança Biológica, 627
Classificação dos Microrganismos por Classe de Risco, 630
Parasitos, 631
Protozoários
Nematóides
Cestóides
Trematódeos
Descontaminação do Material de Trabalho, 634
Boas Práticas de Laboratório, 635
Comentários, 636

SEÇÃO 10 — IDENTIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO, 639

35. Microscopia Óptica, 641
Suzana Bencke Amato

Considerações Gerais, 641
Componentes do Microscópico Óptico, 642
Fonte Luminosa
Condensador
Platina
Objetivas
Oculares
Iluminação Köhler, 646
Morfometria Feita com Micrômetro Ocular, 646

36. *Blastocystis hominis*, 649
Geraldo Attilio De Carli
Marilise Brittes Rott

Considerações Gerais, 649
Diagnóstico de Laboratório, 651

37. *Pneumocystis carinii*, 655
Luiz Carlos Severo

Considerações Gerais, 655
Abordagem Diagnóstica

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Colheita do Espécime Clínico
Diagnóstico Etiológico
Método Rápido de Coloração pela Prata

38. Diagnóstico e Identificação de Parasitos, 663
Geraldo Attilio De Carli
Tiana Tasca

Considerações Gerais, 663
Protozoários Intestinais, 663
Protozoários com Diferentes Localizações, 667
Protozoários do Sangue e dos Tecidos, 668
Nematóides, 669
Cestóides, 670
Trematódeos, 671
Diagnóstico dos Protozoários Intestinais, 671
Amebas Intestinais, 672
Flagelados Intestinais, 679
Ciliados Intestinais, 683
Coccídios Intestinais, 684
Trichomonas spp., 686
Diagnóstico dos Protozoários do Sangue e dos Tecidos, 688
Critérios para a Diferenciação das Espécies do Gênero *Plasmodium*, 690
Diagnóstico dos Helmintos, 696
Nematóides Intestinais, 702
Nematóides do Sangue e dos Tecidos, 708
Cestóides Intestinais, 711
Cestóides dos Tecidos, 714
Trematódeos do Sangue, Fígado e Pulmões, 714
Parasitos Humanos de Importância Clínica, 717
Parasitos Humanos e suas Localizações Primárias, 720

SEÇÃO 11 — APÊNDICE, 725

Apêndice 1 — Soluções, Corantes, Reagentes, Fixadores, 727
Geraldo Attilio De Carli

Considerações Gerais, 727
Anticoagulantes, 727
Corantes, 729
Preparações Permanentes para Ovos e Larvas de Helmintos, 733
Fixadores/Preservadores, 735
Meios de Montagem, 740
Soluções Salinas Balanceadas, 741
Soluções Tamponadas, 742
Massa Molecular

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Solução Molar (M)
Solução Tamponada de Fosfatos (Sörensen)
Solução Tamponada de Fosfatos 0,2 M
Tampão PBS (*Phosphate Buffer Solution*), pH 7,2
Solução para Limpeza de Vidraria

Apêndice 2 — Livros, Atlas, *Abstracts* e Periódicos, 747
Geraldo Attilio De Carli

Parasitologia Geral, Parasitologia Clínica e Medicina Tropical, 747
Livros
Atlas
Abstracts
Periódicos

Apêndice 3 — Parasitologia Humana — Websites e Internet, 759
Geraldo Attilio De Carli

Fotografias, Figuras e Desenhos (*Images*), 759
Guia de Fontes de Pesquisa, 759
Parasitology Name Index, 759
Imagens de Parasitos, 763
Informações sobre a Parasitologia, 764
Referências Bibliográficas, 764

Abreviaturas, 765

Índice Remissivo, 767

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte



SEÇÃO 1

Parasitos Intestinais

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Capítulo 1



Colheita e Preservação da Amostra Fecal

Geraldo Attilio De Carli

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A maioria dos parasitos intestinais é diagnosticada pelo exame das fezes, embora outros materiais, como urina, escarro, secreções urogenitais, aspirados, tecidos, conteúdo duodenal e espécimes obtidos por biópsia, possam ser utilizados para a identificação de certas espécies. Os estágios usuais de diagnóstico são os ovos e as larvas de helmintos e os trofozoítos, cistos, oocistos e esporos de protozoários. Na realidade, uma identificação segura e correta de um parasito depende de critérios morfológicos, os quais estão sujeitos a 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 para o diagnóstico. Os espécimes submetidos ao exame em condições ótimas deverão ser colhidos recentemente, sem contaminação e convenientemente preservados.

Freqüentemente fragmentos de alimentos, células vegetais, grãos de pólen, leucócitos, células de tecido animal 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. O bolo fecal normal é composto quase que exclusivamente de fezes, mas em certas situações uma porção do bolo pode ser constituída de sangue e muco, ou ter considerável quantidade de tecido morto. Neste

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

caso, essas porções da massa fecal evidenciam uma infecção parasitária, quando não obstante, o exame das fezes pode fornecer um resultado negativo. Adultos de *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, proglotes de *Taenia* spp. e de *Dipylidium caninum*[26] podem ser encontrados no bolo fecal, sem que a presença de ovos seja identificada. Por esta razão o exame macroscópico deve sempre preceder ao exame microscópico[1,8,9,17,18,19,23,31].

COLHEITA

Fezes Emitidas Espontaneamente

A detecção e a identificação dos parasitos intestinais estão em relação direta com a qualidade da amostra entregue ao laboratório. Na colheita dos espécimes fecais, vários fatores devem ser considerados: tipo do recipiente, volume, idade da amostra, as drogas e os compostos químicos, que podem interferir na realização do exame. O paciente deve receber instruções impressas para facilitar a colheita das fezes. Cada amostra deverá apresentar no mínimo as seguintes informações: nome do paciente, número de identificação, nome do médico, data e horário da colheita, a qual deverá ser acompanhada de uma requisição médica, indicando o procedimento laboratorial a ser seguido. O recipiente deve ser limpo e seco, com boca larga, com capacidade aproximada de 250ml, para que possa receber uma amostra significativa e que tenha vedação hermética, para impedir o derrame, permitindo a preservação da umidade. A amostra seca na superfície e nas bordas deverá ser rejeitada. As fezes devem ser colhidas diretamente no frasco, ou em urinol, ou, ainda, em jornal ou em papel limpo e transferidas diretamente para o recipiente. O pote deve estar livre de anti-sépticos, de agentes germicidas, gotas de óleo e de urina para evitar a destruição das formas vegetativas. As fezes excretadas no solo não devem ser usadas, pois larvas de vida livre e outros contaminantes provenientes do solo poderiam confundir o diagnóstico. Fezes obtidas de privadas (latrinas) não podem ser aproveitadas, não somente devido ao risco de contaminação, mas porque a água e a urina poderiam destruir as formas trofozoíticas.

Para permitir um exame macro e microscópico satisfatório todo o bolo fecal deve ser enviado ao laboratório; caso este procedimento não possa ser cumprido, uma quantidade mínima de 20 a 30g pode ser empregada na análise. Esta conduta não somente abastece o laboratório com suficiente material para a realização de várias técnicas, como permite ao técnico selecionar uma porção específica para o exame. As fezes pastosas ou mucosas são indicadas para a preparação de esfregaços corados e as porções formadas são empregadas nas técnicas de concentração. Os espécimes fecais nunca devem ser incubados (37°C) ou congelados antes do exame, exceto para a pesquisa de oocistos de *Cyclospora cayetanensis*[32], esta amostra permite estudos baseados na Biologia Molecular.

Certos medicamentos e produtos químicos podem tornar a amostra insatisfatória para a análise ou para a pesquisa dos protozoários intestinais. Entre estes, citam-se os antidiarréicos, os antibióticos, os antiácidos, deri-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

vados de bismuto e do bário, a vaselina e os óleos minerais. A pesquisa parasitológica deve ser realizada antes do paciente ser submetido a um exame radiológico, com a administração do contraste sulfato de bário. As amostras excretadas que contenham bário ou bismuto são inaceitáveis para o exame, visto que partículas desses produtos podem interferir no exame pelo excesso de substâncias cristalinas, as quais podem destruir os trofozoítos devido à sua ação abrasiva. A colheita deve ser retardada por um período de sete a 10 dias.

Os antibióticos, como tetraciclina, afetam a flora intestinal normal e freqüentemente causam diminuição ou ausência temporária dos organismos nas fezes, visto que esses parasitos se alimentam de bactérias intestinais, e um diagnóstico seguro não é possível antes de duas a três semanas. O número de amostras necessárias para a identificação de parasitos intestinais varia de acordo com a qualidade do espécime, com a análise que será realizada e com a gravidade da infecção.

Os recipientes com amostras fecais, recebidos de pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e sua seqüela, a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS), deverão ser protegidos por um invólucro de plástico e identificados com etiqueta vermelha ou HIV positivo[1,18,23].

AMOSTRAS MÚLTIPLAS

A possibilidade de encontrar organismos aumenta pelo exame de amostras múltiplas, em razão: a) da intermitência da passagem de certos parasitos a partir do hospedeiro; b) da distribuição não uniforme dos ovos dos helmintos; c) dos estágios dos protozários e d) das limitações das técnicas de diagnóstico. Em uma única passagem normal são revelados somente de um terço à metade das espécies presentes na massa fecal. Em geral os nematóides, como *A. lumbricoides*, ancilostomídeos e *Trichuris trichiura*, emitem ovos com certa continuidade, os quais podem ser detectados diariamente nas fezes. Em outras espécies de parasitos, especialmente nos protozoários, a emissão dos estágios é irregular. O número de cistos de *Entamoeba histolytica* que passa junto com as fezes apresenta oscilações diárias, e com picos cíclicos que ocorrem entre sete e 10 dias. Os cistos de *Giardia lamblia* apresentam intermitência de passagem com intervalos que variam de dois a três dias para sete, oito ou mais dias. A produção de ovos também é irregular em certos helmintos, particularmente no gênero *Schistosoma*. As proglotes das espécies de *Taenia* passam com interrupções, sendo preferível obter as proglotes em intervalos de dois a três dias.

A emissão dos estágios de diagnóstico varia com as diferentes espécies de parasitos. Nas infecções com *Ascaris*, *Trichuris* e ancilostomídeos os ovos são emitidos continuamente. Entretanto, em outras infecções, como na teníase, giardíase, dientamebíase e estrongiloidíase, o número de estágios de diagnóstico emitidos varia significativamente de um dia para outro, podendo não serem detectados até que o paciente atinja a fase sintomática. As razões da emissão cíclica dos estágios de alguns protozoários ainda não está completamente entendida. Em alguns helmintos, incluindo o *E. vermicularis* e a *Taenia* spp., os ovos são liberados somente esporadicamente, pelo ver-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

me intacto ou pelo rompimento das proglotes, resultando em distribuição desigual no espécime fecal com variações de um dia para o outro. Nos parasitos que habitam o intestino delgado (*Strongyloides stercoralis*, ancilostomídeos, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* e *G. lamblia*) ou próximo ao intestino grosso (outros protozoários e helmintos produtores de ovos) os estágios de diagnóstico usualmente estão distribuídos irregularmente no espécime fecal. Os parasitos que infectam o reto e o baixo cólon podem também apresentar uma distribuição anormal no bolo fecal. Os vermes adultos do esquistossomo, dependendo da espécie, ovipõem nas pequenas vênulas do intestino ou na bexiga. Nos pacientes com colite amebiana (*E. histolytica*) pode haver uma relação entre a emissão fecal dos trofozoítos, que são mais numerosos na superfície do que no centro das fezes emitidas, e as áreas ulceradas do cólon.

Não existe uma uniformidade de conduta relacionada com o número de amostras que devam ser colhidas. Como a maioria dos estágios de diagnóstico não aparece no material fecal em número constante todos os dias, a colheita das fezes em dias alternados propiciará uma porcentagem maior de resultados positivos. Um procedimento aconselhável é colher, em dias separados, uma série de três espécimes em não mais de 10 dias ou uma série de seis amostras, em dias alternados, dentro de 14 dias. Fezes emitidas espontaneamente apresentam uma probabilidade maior de conter cistos, os quais podem ser identificados com maior confiabilidade do que os trofozoítos.

O número de amostras necessárias para a demonstração de parasitos intestinais varia de acordo com a qualidade dos espécimes submetidos ao estudo; a exatidão das análises realizadas e com a gravidade da infecção. Alguns autores recomendam, no mínimo, a colheita de três amostras antes de iniciar o tratamento, duas obtidas através de evacuações normais e a terceira depois da administração de um laxante[29]. Após o tratamento, deverão ser colhidas três amostras. Um novo exame deverá ser realizado três a quatro semanas após o tratamento dos pacientes que receberam medicação para protozários. Nos casos de infecções por helmintos o controle se efetuará uma a duas semanas após o tratamento; para as tênias, um novo exame será necessário após cinco a seis semanas.

Observações

1. A criptosporidiose sintomática usualmente está associada a um substancial número de oocistos nas fezes, tornando facultativa a necessidade da concentração das fezes antes da aplicação dos métodos diretos de diagnóstico (esfregaços permanentes corados).

2. O número de oocistos é variável, mesmo nas fezes líquidas, e por esta razão amostras múltiplas de fezes devem ser testadas antes de reportar um diagnóstico como negativo.

3. Os oocistos da *Cyclospora cayetanensis* são excretados intermitentemente, esporadicamente e raramente em pequeno número; logo, algumas técnicas para concentrar oocistos têm sido usadas com freqüência como parte da rotina dos procedimentos de diagnóstico[13,33].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

FEZES EMITIDAS COM O USO DE LAXANTES

Em alguns casos, fezes liquefeitas, obtidas pela administração de laxantes, são necessárias para estabelecer e confirmar os diagnósticos de amebíase, giardíase e estrongiloidíase. O uso de laxantes requer solicitação médica e é indicado nos casos em que uma série de exames for negativa. São recomendados laxantes salinos, como o fosfato de sódio e o sulfato de sódio tamponado, porque causam menos danos morfológicos aos parasitos. Não são indicados os óleos minerais, os compostos de bismuto e de magnésio, pois os glóbulos de óleo interferem no exame, os restos de cristais de bismuto e de magnésio podem obscurecer os organismos, ou afetar a aparência dos trofozoítos. Todas as fezes induzidas por purgativos devem ser totalmente colhidas e levadas imediatamente ao laboratório. Caso este procedimento não possa ser obedecido, uma fração do material deverá ser preservada com o fixador álcool polivinílico (fixador APV). No material obtido após a catarse são pesquisados ovos, larvas, cistos e trofozoítos. A prática do uso de purgativos é indicada para clínicas e hospitais, onde teoricamente os espécimes fecais são recebidos pelo laboratório imediatamente após a colheita.

ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS

O tempo de colheita das amostras fecais influi de maneira direta na identificação dos parasitos. Desde que os trofozoítos de protozoários não se multiplicam ou se encistam fora do corpo humano, eles morrem e se degeneram após a excreção das fezes. O tempo de exame recomendado para os espécimes líquidos é de 30 minutos, enquanto as amostras pastosas devem ser examinadas dentro de uma hora após a evacuação; não sendo possível observar esta orientação, o material deverá ser preservado. Os limites de tempo não são críticos quando se tratam de amostras sólidas, podendo ser estudadas dentro de 24 horas após a excreção. Neste caso, uma porção do espécime pode ser preservada e outra refrigerada. Quando os critérios indicados para a colheita e exame das amostras fecais não puderem ser observados, o laboratório deverá solicitar uma amostra adicional.

PRESERVAÇÃO DA AMOSTRA FECAL

Para preservar a morfologia dos protozoários e prevenir um contínuo desenvolvimento de alguns ovos e larvas de helmintos, as amostras fecais que não forem entregues ao laboratório imediatamente após a passagem deverão ser preservadas. Os espécimes não preservados podem ser temporariamente refrigerados (3°C a 5°C) em recipientes hermeticamente fechados para evitar o dessecamento e imediatamente após, enviados ao laboratório. Nessas temperaturas os ovos, as larvas e os cistos mantêm-se viáveis durante vários dias, enquanto as larvas de *S. stercoralis* e dos ancilostomídeos poderão sofrer alterações morfológicas. A preservação permanente de trofozoítos, cistos, ovos e larvas é realizada através de vários preservadores, como formalina, mertiolato-iodo-formaldeído (MIF), acetato de sódio-ácido

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

acético-formaldeído (SAF), álcool polivinílico (fixador APV), líquido de Schaudinn e fenol-álcool-etílico-formaldeído (PAF) (Tabela 1.1).

Os mesmos protocolos, procedimentos e medidas de segurança desenvolvidos para os espécimes fecais coletados para o diagnóstico de outras parasitoses intestinais são aplicados para os organismos *C. parvum* e *Cyclospora cayetanensis*. As fezes, na pesquisa de oocistos desses coccídios, podem ser examinadas frescas ou preservadas na solução tamponada de formaldeído a 10% (v/v), como também emulsificadas na solução de bicromato de potássio a 2,5% (m/v). Nessa solução os oocistos de *C. parvum* estocados à temperatura de 4°C permanecem viáveis durante três meses, podendo manter sua infectibilidade, em alguns casos, por mais de 12 meses. Essa solução não é preservadora, entretanto é usada na rotina como um meio de armazenamento e de manutenção da viabilidade dos oocistos. Portanto, para tornar os oocistos inviáveis é recomendado preservar os espécimes fecais na solução tamponada de formaldeído a 10% ou no fixador acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF). O tempo necessário de contato entre as fezes e a solução tamponada de formaldeído a 10% para matar os oocistos não está determinado, entretanto é estimado o período de 18 a 24 horas. A solução tamponada de formaldeído a 10% apresenta a vantagem de preservar os oocistos, destruir o seu poder patogênico e inativar outros agentes infecciosos. A solução fixadora álcool polivinílico (fixador APV) não é recomendada para a preservação de oocistos devido a sua incompatibilidade com os métodos de coloração derivados de Ziehl-Neelsen e com as técnicas de concentração[1,23]. Alguns parasitologistas recomendam armazenar os

Tabela 1.1
Amostras Fecais: Preservadores Usados no Diagnóstico Parasitológico

Preservadores	*Estágio de Diagnóstico*	*Exame Direto a Fresco*	*Técnicas de Concentração*	*Coloração Permanente*
Temporária				
Refrigeração 3-5°C	C, O, L	Sim	Sim	Sim (HF férrica ou Tr)
Permanente				
Formalina 5-10%	C, O, L, Oc	Não	Sim	
Formalina tamponada 5-10%	C, O, L, Oc	Não	Sim	
MIF	C, O, L	Não	Sim	Corante *Polychrone* IV
Líquido de Schaudinn	T, C	Não	Não	Sim (HF férrica ou Tr)
Schaudinn mod. (sem APV)	T, C	Não	Não	Sim (HF férrica ou Tr)
APV	T, C, O	Não	Sim	Sim (HF férrica ou Tr)
APV mod.	T, C, O	Não	Sim	Sim (HF férrica ou Tr)
SAF	T, C, O, Oc	Não	Sim	Sim (HF férrica)
PAF	T, C, O, L	Não	Não	Tionina/Azur A

T = trofozoíto; C = cisto; O = ovo; L = larva; Oc = oocisto; Schaudinn mod. = Schaudinn modificado; APV = fixador álcool polivinílico; APV mod. = fixador álcool polivinílico modificado; MIF = mertiolato-iodo-formaldeído; SAF = acetato de sódio-ácido acético-formaldeído; PAF = fenol-álcool etílico-formaldeído, HF = hematoxilina férrica; Tr = tricrômico.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

oocistos de *C. parvum* em soluções salinas balanceadas suplementadas com antibióticos, como a solução de Hanks (HBSS), com 10.000UI/ml de penicilina, 10mg/ml de estreptomicina, 0,05g/ml de anfotericina B e 500UI/ml de nistatina[11].

Na pesquisa de oocistos de *Cyclospora cayetanensis* uma parte da amostra não preservada pode ser congelada[33]. Essa amostra permite o armazenamento por um longo período de tempo, a realização de diferentes avaliações e, principalmente, estudos baseados na Biologia Molecular (reação em cadeia da polimerase — PCR), os quais não poderiam ser realizados com amostras fecais formolizadas[24].

Os esporos dos microsporídios são preservados pela solução tamponada de formaldeído a 10%.

Solução de Formaldeído

A formalina (solução de formaldeído) é usada para a preservação dos estágios de diagnóstico de protozoários e helmintos. Duas concentrações são recomendadas: 5% para a preservação de cistos de protozoários e 10% para oocistos de coccídios, esporos de microsporídios, ovos e larvas de helmintos. Na rotina, a solução a 5% é preferida à solução a 10%, porque os cistos e os ovos de *Hymenolepis nana*, *H. diminuta* e larvas de *S. stercoralis* poderão ser distorcidos e/ou alterados. Os ovos de *A. lumbricoides* e, algumas vezes, de *T. trichiura* continuam o seu desenvolvimento nas concentrações de 5%, não havendo interferência na identificação dessas espécies. A solução de formaldeído a quente (60ºC) pode também ser usada para espécimes que contenham ovos, desde que a fixação a frio não impede o desenvolvimento embrionário de muitos ovos, os quais tornam-se infectivos e permanecem viáveis por longos períodos. A formalina não é recomendada para a fixação de trofozoítos. A solução de formaldeído neutra é mais eficaz na manutenção das características morfológicas, especialmente na fixação de cistos. Por esta razão é indicada a solução de formaldeído tamponada com fosfato de sódio[1,18,23].

Reagentes

1. Formaldeído 37-40% (HCHO)
2. Solução salina a 0,85%
3. Hidrogenofosfato dissódico ($Na_2HPO_4.7H_2O$)
4. Diidrogenofosfato de sódio ($NaH_2PO_4.H_2O$)

Preparação das Soluções

1. Solução de Formaldeído a 5% e 10% (v/v)

Formaldeído 37-40%	5ml	10ml
Água destilada-deionizada	95ml	90ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Solução Salina de Formaldeído a 5% e 10% (v/v)

Formaldeído 37-40%	5ml	10ml
Solução salina a 0,85%	95ml	90ml

3. Solução Tamponada de Formaldeído a 5% e 10%

Hidrogenofosfato dissódico	6,10g	0,10g
Diidrogenofosfato de sódio	0,15g	0,15g
Formaldeído 37-40%	400ml	800ml
Água destilada-deionizada	7.600ml	7.200ml

• Misturar o formaldeído com a água. Adicionar os sais Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 e agitar vigorosamente. Para a rotina diária aconselha-se preparar quantidades pequenas: para cada litro de solução de formaldeído a 5% ou 10%, adicionar 0,8g da mistura tampão. A água destilada-deionizada poderá ser substituída pela solução salina a 0,85% para a preparação de solução salina tamponada de formaldeído.

4. Solução Salina a 0,85% ou Solução Fisiológica (m/v)

Cloreto de sódio (NaCl)	0,85g
Água destilada-deionizada	100ml

Preservação da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.
2. Misturar uma porção de fezes em três volumes de solução de formaldeído.
3. A solução aquosa de formaldeído permite somente o exame a fresco, não sendo indicada para a preparação de esfregaços corados para a identificação de protozoários intestinais.
4. Certos protozoários e helmintos apresentam problemas à fixação; entre eles estão os cistos de *E. histolytica*, ovos de *H. nana* e larvas rabditóides de *S. stercoralis*.
5. Os outros parasitos são facilmente fixados e permanecem por longo período em ótimas condições para análise.

Observações: O formaldeído comercial apresenta a concentração de 37-40% de solução de HCHO, embora para a diluição considera-se 100% (ver Apêndice 1 e p. 9).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

REVISÃO: SOLUÇÃO DE FORMALDEÍDO A 5% E 10% (TAMPONADA E NÃO TAMPONADA)

Vantagens: a) excelente preservador de amostras fecais (cistos, oocistos e esporos de protozoários e ovos e larvas de helmintos) para as técnicas de concentração; b) de fácil preparação e longo período de validade; c) o sedimento concentrado pode ser usado para a preparação de esfregaços permanentes corados pelos derivados de Ziehl-Neelsen e com *kits* para o diagnóstico com monoclonais e d) os organismos são fixados em duas a quatro horas, exceto o *A. lumbricoides*.

Desvantagens: a) não preserva os trofozoítos dos protozoários e b) a morfologia dos organismos não é preservada adequadamente para as colorações permanentes.

Fixador de Schaudinn

O fixador de Schaudinn[30] é freqüentemente usado na preservação de fezes frescas ou amostras da superfície da mucosa intestinal. Esta solução fixadora é usada para a preparação de esfregaços permanentes corados para a demonstração de protozoários intestinais. O grande problema do fixador de Schaudinn é a presença do cloreto de mercúrio-II na sua fórmula, substância tóxica ao homem e ao meio ambiente. Os frascos deverão ser etiquetados como **VENENO**[15,16,18].

Reagentes

1. Cloreto de mercúrio-II (ou mercúrico) ($HgCl_2$)
2. Álcool etílico a 95% (C_2H_6O)
3. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
4. Glicerina ($C_3H_8O_3$)

Preparação das Soluções

1. Solução Aquosa Saturada de Cloreto de Mercúrio-II

Cloreto de mercúrio-II	110g
Água destilada-deionizada	1.000ml

• Dissolver o $HgCl_2$ em água destilada-deionizada quente. Aquecer em banho de água até a completa dissolução do sal. Deixar esfriar e filtrar a solução. Estocar em recipiente de vidro com tampa esmerilhada.

2. Solução Estoque

Solução aquosa de cloreto de mercúrio-II	600ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Álcool etílico a 95%	300ml
Glicerina	15ml

3. Solução Fixadora

Solução estoque	100ml
Ácido acético glacial	5ml

• Adicionar o ácido acético glacial, imediatamente, antes do uso.

Preservação da Amostra

1. Esfregaços estirados devem ser preparados com as amostras fecais frescas.

2. Após a preparação, mergulhar as lâminas durante 30 minutos no fixador.

3. Terminada a fixação, os esfregaços estão prontos para serem corados, montados e examinados.

Controle de Qualidade: Fixador de Schaudinn

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colher sangue venoso em tubo de centrífuga de 15ml contendo EDTA (usar sangue com alta contagem de leucócitos). Agitar com cuidado.

3. Centrifugar (300 x *g* por dois minutos) e remover a camada de leucócitos.

4. Misturar os leucócitos com aproximadamente 2 a 4g de fezes frescas pastosas. Agitar com cuidado.

5. Colocar em lâmina de microscopia, perto de uma das extremidades, uma gota da mistura fezes-leucócitos. Com outra lâmina, estirar a mistura da direita para a esquerda, em direção ao lado oposto. Preparar vários esfregaços e mergulhar imediatamente na solução fixadora de Schaudinn. Com a finalidade de garantir melhor fixação, as lâminas são colocadas na solução fixadora de Shaudinn com a face do esfregaço virada para baixo, ou em cubas de *Coplin*, que podem ser usadas nessa fase do processo de coloração.

6. Após a coloração, se os leucócitos estiverem bem fixados, apresentando morfologia típica, todos os protozoários intestinais fixados no mesmo lote do fixador de Schaudinn serão muito bem fixados, indicando que a amostra fecal estava fresca e fixada dentro dos limites recomendados de tempo.

7. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[8,9,17].

Observações: Os esfregaços fixados pelo Schaudinn apresentam excelentes resultados de coloração quando corados pela hematoxilina férrica segundo Heidenhain ou pelo tricrômico.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

REVISÃO: FIXADOR DE SCHAUDINN

Vantagens: a) usado para a preservação de fezes frescas ou amostras da superfície da mucosa intestinal; b) produz excelente preservação dos trofozoítos e cistos de protozoários; e c) os esfregaços fixados pelo Schaudinn apresentam ótimos resultados de coloração quando corados pela hematoxilina-férrica, segundo Heidenhain ou pelo tricrômico.

Desvantagens: a) não é recomendado para as técnicas de concentração; b) contém na fórmula cloreto de mercúrio-II e c) apresenta fraca capacidade de adesão à lâmina quando é usado com espécimes líquidos ou mucóides.

Fixador de Schaudinn Modificado

Horen[20] substituiu o cloreto de mercúrio-II ($HgCl_2$) pelo sulfato de cobre ($CuSO_4.5H_2O$) na formulação do fixador de Schaudinn, como também na preparação do fixador álcool polivinílico (fixador APV). A resina álcool polivinílico (APV) se dissolve mais rapidamente no fixador modificado do que no convencional fixador de Schaudinn[9,10,18,20].

Reagentes

1. Sulfato de cobre II (ou cúprico) ($CuSO_4.5H_2O$)
2. Álcool etílico a 95% (C_2H_6O) (v/v)
3. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
4. Glicerina ($C_3H_8O_3$)

Preparação das Soluções

1. Solução de Sulfato de Cobre

Sulfato de cobre II.$5H_2O$	20g
Água destilada-deionizada	1.000ml

• Dissolver o $CuSO_4.5H_2O$ em água destilada-deionizada quente. Deixar esfriar. Armazenar em recipiente de vidro com tampa esmerilhada.

2. Solução Estoque

Solução de sulfato de cobre II	600ml
Álcool etílico a 95%	300ml
Glicerina	15ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

• Armazenar até o momento do uso.

3. Solução Fixadora

Solução estoque	100ml
Ácido acético glacial	5ml

• Adicionar o ácido acético glacial, imediatamente, antes do uso.

Fixador Álcool Polivinílico (Fixador APV)

Brooke e Goldman[3] desenvolveram a solução fixadora álcool polivinílico (fixador APV). O álcool polivinílico é uma resina solúvel em água, que é incorporada ao fixador de Schaudinn. Quando fezes e o fixador APV são misturados e estirados sobre uma lâmina de microscopia, o pó APV age como um adesivo para o material fecal. A adesão é devida aos componentes da resina e a fixação ao líquido de Schaudinn. A solução fixadora APV é indicada para cistos e trofozoítos, os quais são conservados de meses a anos. A grande vantagem do uso do fixador APV está na preparação de esfregaços permanentemente corados, sem que os organismos sejam danificados, como nas técnicas de concentração (sedimentação) que poderão ser realizadas a partir de fezes preservadas. A solução fixadora APV é estável por seis meses a um ano, quando conservada em frasco hermeticamente fechado. O frasco deverá conter uma etiqueta com a data de validade e a identificação do fixador como **VENENO**[15,16,18]. O APV é fabricado por diferentes produtores, mas os graus de hidrólise e a baixa ou média viscosidade são importantes para a preparação da solução fixadora. O APV (Evanol) é fabricado pela J.T. Baker Co. e pela Eastman Chemical Co., EUA.

Reagentes

1. Fixador de Schaudinn (ver p. 11)
2. Álcool etílico a 95% (C_2H_6O) (v/v)
3. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
4. Glicerina ($C_3H_8O_3$)
5. Álcool polivinílico (APV), pó

Preparação das Soluções

1. Fixador APV, segundo Burrows[4,5]

Fixador de Schaudinn	93,5ml
Ácido acético glacial	5ml
Glicerina	1,5ml
APV, pó	5g

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Fixador APV, segundo Brooke e Goldman[3]

Fixador de Schaudinn	125ml
Ácido acético glacial	10ml
Glicerina	3ml
Álcool etílico a 95%	62,5ml
APV, pó	10g

3. Preparação da Solução Fixadora APV

1. Misturar em um *beaker* os componentes líquidos.
2. Adicionar lentamente, sem agitação, o pó APV.
3. Deixar a mistura em repouso de 18 a 24 horas para permitir que o pó APV seja embebido pelos líquidos. Cobrir o *beaker* com uma tampa de placa de Petri ou com papel-alumínio.
4. Após, aquecer a solução lentamente até 75°C. Quando a temperatura for atingida, remover o *beaker* do aquecimento e agitar a mistura até uma completa homogeneização. Uma solução viscosa clara e levemente esbranquiçada é obtida em 30 segundos.
5. Estocar o preservador APV em frasco de plástico com tampa de rosca ou em um frasco de vidro com tampa esmerilhada.

Observações: Pequenas quantidades do fixador APV podem ser mantidas em frasco conta-gotas para a rotina diária.

Preservação da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.
2. Para obter todas as vantagens do fixador APV como preservador, as amostras fecais devem ser vigorosamente misturadas com a solução fixadora imediatamente após a excreção, antes que os organismos alterem as suas características morfológicas.
3. Usar aproximadamente três partes do fixador para uma parte de fezes.
4. O material fecal pode ser misturado com o fixador APV em lâminas de microscopia para a preparação de esfregaços ou em frascos.
5. A preparação e a fixação direta em esfregaços são indicadas quando a quantidade de material é pequena e/ou quando os trofozoítos são identificados em esfregaços salinos, havendo a necessidade de uma coloração permanente para a confirmação final do diagnóstico.
6. A preservação do material fecal em frascos é aconselhada para a rotina diária, quando o laboratório recebe uma quantidade satisfatória de fezes.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Preservação Direta em Esfregaços

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colocar três gotas do fixador APV em uma lâmina de microscopia e emulsificar uma gota de fezes com o preservador.

3. Preparar um esfregaço fino, estirando a mistura sobre um terço da superfície da lâmina e, após, colocá-la na posição horizontal para secar à temperatura ambiente ou na estufa a 37°C.

4. Os esfregaços secos permanecem viáveis para a coloração durante meses. Melhores resultados são obtidos quando a coloração é realizada dentro de um período de dois meses após a preparação dos esfregaços.

5. A solução do fixador APV não é recomendada para espécimes de pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e de sua seqüela, a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS).

6. Os oocistos de coccídios preservados com o fixador APV não apresentam bons resultados quando corados pelos métodos derivados de Ziehl-Neelsen (fucsina-fenicada).

Preservação em Frascos

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Uma parte da amostra é vigorosamente misturada em um frasco com três ou mais partes do fixador APV.

3. O método de preservação em frascos é um excelente procedimento para enviar material fecal preservado para um laboratório central de referência ou com propósitos de ensino e/ou de treinamento.

Controle de Qualidade: Fixador Álcool Polivinílico

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Misturar aproximadamente 2g de fezes frescas pastosas com 10ml do fixador APV (solução pronta para o uso).

3. Adicionar várias gotas de sedimento de leucócitos (como foi descrito no fixador de Schaudinn) à mistura do fixador APV-fezes.

4. Depois de 30 minutos de fixação, colocar em lâmina de microscopia, perto de uma das extremidades, uma gota do material (mistura de fezes-fixador APV-leucócitos). Com outra lâmina, estirar a mistura da direita para a esquerda, em direção ao lado oposto. Deixar secar (60 minutos à temperatura ambiente e 30 minutos a 35°C) e corar.

5. Após a coloração, se os leucócitos estiverem bem fixados, apresentando morfologia e coloração típica, todos os protozoários intestinais fixados no mesmo lote do fixador APV serão muito bem fixados, mostrando que a amostra fecal estava fresca e fixada dentro dos limites recomendados de tempo.

6. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[9,18].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Observações: Os esfregaços fixados pelo fixador APV apresentam excelentes resultados de coloração quando corados pela hematoxilina férrica, segundo Heidenhain, ou pelo tricrômico. O cloreto de mercúrio-II foi substituído pelo sulfato de cobre ou pelo sulfato de zinco na fórmula dos novos preservadores, com o objetivo de aumentar a qualidade de preservação da morfologia dos protozoários na coloração de esfregaços permanentes. O sulfato de zinco mostrou ser um excelente substituto do mercúrio, podendo ser usado na coloração de esfregaços permanentes corados pelo tricrômico. Apesar de estar sendo usado com muita freqüência, a sua fórmula não foi divulgada e continua sendo propriedade de diferentes laboratórios[15,16,18].

REVISÃO: FIXADOR ÁLCOOL POLIVINÍLICO (FIXADOR APV)

Vantagens: a) excelente preservador de trofozoítos e cistos de protozoários para coloração de esfregaços permanentes; b) muito boa adesão das amostras fecais à lâmina; c) longo período de validade (meses a anos); d) os esfregaços fixados apresentam ótimos resultados de coloração quando corados pela hematoxilina-férrica, segundo Heidenhain, ou pelo tricrômico e e) os organismos são fixados em uma a duas horas.

Desvantagens: a) contém na fórmula cloreto de mercúrio-II (fixador de Schaudinn); b) de difícil preparação no laboratório; c) não é indicado para as técnicas de concentração; d) amostras preservadas pelo fixador APV não podem ser usadas na coloração de esfregaços permanentes corados pelos derivados de Ziehl-Neelsen (fucsina-fenicada); e) ovos de *T. trichiura* e cistos de *G. lamblia* não são facilmente concentrados como nos fixadores que possuem na fórmula a formalina; f) a morfologia das larvas de *S. stercoralis* é alterada e os oocistos de *Isospora belli* podem não ser visíveis nas amostras preservadas pelo fixador APV e g) torna-se branco ou gelatinoso quando começa a desidratar ou quando é refrigerado. O material preservado no fixador APV não pode ser usado nos testes imunológicos.

Fixador Álcool Polivinílico Modificado

Reagentes

1. Sulfato de cobre II (ou cúprico) ($CuSO_4.5H_2O$)
2. Álcool etílico a 95% (C_2H_6O) (v/v)
3. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Preparação das Soluções (fixador de Schaudinn modificado)

1. Solução de Sulfato de Cobre

Sulfato de cobre	20ml
Água destilada-deionizada	1.000ml

• Dissolver o $CuSO_4.5H_2O$ em água quente. Aquecer em banho de água até a completa dissolução do sal. Deixar esfriar e filtrar a solução.

2. Fixador APV Modificado (solução estoque)

Solução de sulfato de cobre	600ml
Álcool etílico a 95%	300ml

3. Solução Fixadora

Solução estoque	100ml
Ácido acético glacial	5ml

• Adicionar o ácido acético glacial imediatamente antes do uso.

REVISÃO: FIXADOR ÁLCOOL-POLIVINÍLICO MODIFICADO

Vantagens: a) as técnicas de concentração e esfregaços permanentes corados podem ser realizados a partir das fezes preservadas e b) não contém na fórmula cloreto de mercúrio-II.

Desvantagens: a) a morfologia dos protozoários é bastante alterada quando a preservação é realizada com sulfato de cobre; entretanto, a morfologia dos organismos apresenta-se melhor quando na preservação é usado sulfato de zinco e b) a visualização dos organismos é bastante difícil.

FIXADOR MERTIOLATO-IODO-FORMALDEÍDO (MIF)

Sapero e Lawless[27] e Sapero, Lawless e Strone[28] descreveram o corante-fixador mertiolato-iodo-formaldeído (MIF). Esse corante permite obter ao mesmo tempo a preservação e a coloração de quase todos os estágios dos protozoários, de ovos e larvas de helmintos que se encontram nas fezes. Este procedimento possibilita também um exame direto a fresco imediato do material fecal ou depois de várias semanas, sem a necessidade de outra coloração. Entretanto, com freqüência, esta conduta não apresenta bons resultados no diagnóstico de todos os protozoários intestinais, sendo necessária a preparação de outros esfregaços para uma coloração permanente. Este processo de fixação apresenta certas desvantagens, como a precipitação do iodo da solução conservadora[12]. O corante-fixador MIF é composto por duas soluções estoques mantidas separadamente em frascos âmbar e

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

misturadas, imediatamente antes do uso. Este método é indicado para trabalhos de campo. Blagg e cols.[2] mostraram que o sedimento resultante da centrifugação do material fecal conservado pelo MIF apresenta melhores resultados do que o exame direto a fresco com o MIF na pesquisa de protozoários e ovos de helmintos intestinais.

Reagentes

1. Formaldeído 37-40% (HCHO)
2. Tintura de mertiolato (Timerasol), n.º 99, 1:1.000 (Lilly)
3. Glicerina ($C_3H_8O_3$)
4. Iodeto de potássio, forma cristalina (KI)
5. Iodo, forma cristalina (I_2)

Preparação das Soluções

1. Solução I (Solução estoque MF, estável)

Glicerina	2ml
Formaldeído 37-40%	10ml
Tintura de mertiolato, 1:1000	80ml
Água destilada-deionizada	100ml

• Manter a solução em frasco âmbar.

2. Solução II (Solução de Iodo de Lugol)

Iodo, cristais	5g
Iodeto de potássio	10g
Água destilada-deionizada	100ml

• O iodeto de potássio é dissolvido em água e o iodo é adicionado lentamente com agitação até sua completa dissolução. Filtrar e manter a solução em frasco âmbar.

Preservação da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.
2. Misturar 9,4ml da Solução I com 0,6ml da Solução II, imediatamente antes do uso, pois o iodo pode causar uma densa precipitação, impedindo uma boa coloração dos protozoários.
3. Misturar, vigorosamente, uma parte de fezes frescas para duas a três partes da solução MIF.
4. Para examinar, colher uma gota do líquido junto ao sedimento ou na fase intermediária.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Observações

1. A solução fixadora MIF é instável; é recomendado preservar as fezes na Solução I (MF) e adicionar a Solução II ao sedimento, no momento do exame.
2. Coutinho[10] substituiu o mertiolato na Solução I por igual volume de mercuriocromo a 0,2%.

REVISÃO: MERTIOLATO-IODO-FORMALDEÍDO (MIF)

Vantagens: a) no exame direto a fresco os reagentes preservam e coram simultaneamente os organismos; b) de fácil preparação; c) não contém na fórmula cloreto de mercúrio-II; d) longo período de validade; e) indicado para estudos epidemiológicos de campo e f) os organismos são fixados em uma a duas horas.

Desvantagens: a) a morfologia dos organismos é alterada nos esfregaços permanentes corados.

Fixador Acetato de Sódio-Ácido Acético-Formaldeído (SAF)

A solução fixadora acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF) originalmente descrita por Junod[21] e desenvolvida por Yang e Scholten[33] é o resultado de uma pesquisa intensa para obtenção de um método de utilidade ampla, com bom rendimento ao diagnóstico de trofozoítos, cistos e oocistos de protozoários e ovos de helmintos, através de esfregaços permanentes e de preparações concentradas a fresco. O fixador SAF é uma combinação de formaldeído com o acetato de sódio, o qual age como tampão. Esta combinação é estável e não é tóxica, assegurando uma excelente fixação dos organismos com a manutenção de suas características morfológicas. A grande vantagem dessa solução preservadora é não possuir em sua fórmula o cloreto de mercúrio-II. Quando o sedimento é usado para a preparação de esfregaços permanentes, a albumina fixadora de Mayer (ver p. 23) e/ou o soro de cavalo inativado (56°C/30min) são indicados como adesivos do material à lâmina de microscopia. As lâminas depois de secas podem ser fixadas em álcool a 70% (v/v).

Reagentes

1. Acetato de sódio triidratado ($C_2H_3O_2Na.3H_2O$)
2. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
3. Formaldeído 37-40% (HCHO)

Preparação do Fixador

1. Fixador Acetado de Sódio-Ácido Acético-Formaldeído

Acetato de sódio	1,5g

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Ácido acético glacial	2ml
Formaldeído 37-40%	4ml
Água destilada-deionizada	92,5ml

• Misturar em um *beaker* os componentes. Estocar o fixador em frasco de plástico ou em frasco de vidro com tampa esmerilhada.

Preservação da Amostra

Misturar uma parte da amostra com três partes do fixador. O sedimento é usado para a preparação de esfregaços permanentes.

REVISÃO: ACETATO DE SÓDIO-ÁCIDO ACÉTICO-FORMALDEÍDO (SAF)

Vantagens: a) pode ser usado na concentração e na preparação de esfregaços permanentes corados; b) não contém na fórmula cloreto de mercúrio-II; c) de fácil preparação; d) longo período de validade; e) os esfregaços fixados pelo SAF apresentam excelentes resultados de coloração quando corados pela hematoxilina-férrica, segundo Heidenhain e f) os organismos são fixados em uma a duas horas.

Desvantagens: a) requer o uso da albumina fixadora de Mayer para a adesão da amostra fecal à lâmina e b) os esfregaços fixados pelo SAF apresentam resultados regulares de coloração quando corados pelo tricrômico.

CONTROLE DE QUALIDADE DOS PRESERVADORES

Os preservadores para amostras fecais são testados pelos fabricantes com protozoários vivos antes do produto ser vendido. A rotina descrita deverá ser seguida para os preservadores preparados nos laboratórios de Parasitologia. Os preservadores devem ser controlados com freqüência para assegurar se as soluções preservadoras efetivamente preservam os espécimes fecais. Os fixadores álcool polivinílico (fixador APV) e o líquido de Schaudinn devem ser testados durante a preparação de esfregaços permanentes para conferir se amostras de células mantêm suas características morfológicas. As rotinas descritas abaixo devem ser seguidas no controle de qualidade (CQ) do líquido de Schaudinn, do fixador APV, do fixador álcool polivinílico modificado (fixador APV modificado), do fixador acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF) ou do fixador mertiolato-iodo-formaldeído (MIF).

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.
2. Colher sangue venoso em tubo de centrífuga de 15ml contendo EDTA. Usar sangue com alta contagem de leucócitos. Agitar com cuidado. Centrifugar

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

(300 x *g* por 2 minutos) e remover a camada de leucócitos. Misturar os leucócitos com aproximadamente 2 a 4g de fezes frescas pastosas. Agitar com cuidado.

3. Colocar em lâmina de microscopia, perto de uma das extremidades, uma gota da mistura fezes-leucócitos. Com outra lâmina, estirar a mistura da direita para a esquerda, em direção ao lado oposto. Preparar vários esfregaços e mergulhar imediatamente na solução fixadora de Schaudinn. Com a finalidade de garantir melhor fixação, as lâminas são colocadas na solução fixadora de Schaudinn com a face do esfregaço virada para baixo. Cubas de *Coplin* podem ser usadas nessa fase do processo de coloração. Misturar o restante das fezes-sedimento sangüíneo com 10ml dos fixadores APV, APV modificado, SAF ou MIF.

4. Deixar 30 minutos em contato com os preservadores, após preparar os esfregaços. Deixar secar durante 30 minutos à temperatura ambiente ou 30 a 60 minutos a 35°C.

5. Para a identificação dos trofozoítos e cistos de protozoários, corar os esfregaços pelas colorações permanentes usadas na rotina do laboratório.

6. Após a coloração, se os leucócitos estiverem bem fixados e apresentarem morfologia e coloração típica, os protozoários intestinais fixados no mesmo lote da solução fixadora serão perfeitamente preservados, mostrando que a amostra fecal estava fresca e fixada dentro das recomendações dos limites de tempo.

7. A amostra usada para o CQ pode ser concentrada pelos procedimentos de rotina. Quando o preservador é misturado corretamente com as fezes, os leucócitos são visíveis no sedimento concentrado ou na superfície da película (depende da técnica usada).

8. Quando a morfologia dos leucócitos não confirmar uma boa fixação, descrever os resultados e indicar quais os procedimentos de correção que devem ser usados (repetir o teste e preparar um novo preservador).

9. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário, seguir plano de ação para resultados "fora de controle"[8,9].

Observações

1. A fixação apropriada depende dos seguintes parâmetros: a) observar o tempo limite entre a excreção da amostra fecal e a preservação; b) usar a correta proporção entre o preservador e a amostra fecal (3:1); e c) misturar vigorosamente o preservador e a amostra.

2. Usar os corantes apropriados para cada preservador. A coloração final dos esfregaços permanentes corados poderá apresentar dificuldades de visualização no exame microscópico. Alguns exemplos de combinações adequadas: a) fixador de Schaudinn ou fixador APV: corar com hematoxilina férrica ou tricrômico e b) fixador SAF: corar com hematoxilina férrica.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Fixador Fenol-Álcool-Formaldeído (PAF)

O fixador fenol-álcool-formaldeído (PAF) é usado para a preservação de trofozoítos e cistos de protozoários e ovos e larvas de helmintos. Os espécimes fixados e preservados em PAF[6,7,25] podem ser examinados diretamente (usando corantes especiais) ou depois de serem filtrados em gaze e lavados em solução salina a 0,85%. Os esfregaços fixados em PAF apresentam resultados ineficazes quando corados pela hematoxilina férrica, segundo Heidenhain ou pelo tricrômico. Entretanto, esfregaços a fresco corados pela tionina, ou pelo azur A apresentam bons resultados.

Reagentes

1. Fenol, cristais (C_6H_6O)
2. Álcool etílico a 95% (C_2H_6O) (v/v)
3. Formaldeído 37-40% (HCHO)
4. Solução salina 0,85% (ver p. 38)

Preparação da Solução Fenol-Álcool-Formaldeído (PAF)

Fenol (fundido a 44°C)	23ml
Solução salina a 0,85%	825ml
Álcool etílico a 95%	125ml
Formaldeído 37-40%	50ml

• Misturar o fenol com a solução salina. Adicionar o álcool etílico e o formaldeído e agitar vigorosamente. Estocar em recipiente de vidro com tampa esmerilhada.

Preservação da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.
2. Misturar uma parte da amostra com três partes do fixador.
3. Uma gota da suspensão é usada para a preparação de esfregaços.

Observação: Usar com cuidado, já que o fenol é muito corrosivo e é absorvido pela pele.

Albumina Fixadora de Mayer

Quando o material fecal é fixado pela solução fixadora acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF), a albumina fixadora de Mayer é indicada como adesivo do material à lâmina de microscopia para a preparação de esfregaços permanentes[18,22].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Reagentes

1. Claras de ovos de galinha
2. Glicerina ($C_3H_8O_3$)
3. Salicilato de sódio ($C_7H_5O_3Na$), timol ($C_{10}H_{14}O$), tintura de mertiolato 1:1.000), formaldeído 37-40% (HCOH) (1:100)

Preparação

1. Colocar as claras de vários ovos frescos em um prato fundo.

2. Bater as claras com um garfo ou com um batedor de ovos, até que elas estejam brancas e viscosas.

3. Deixar em repouso por uma hora e em seguida retirar a espuma da superfície e transferir o líquido remanescente para uma proveta.

4. Adicionar ao líquido igual volume de glicerina (v/v) e 1g de salicilato de sódio ou timol, ou 0,5ml de tintura de mertiolato ou formaldeído 37-40%, para prevenir a proliferação de fungos, a cada 100ml da mistura.

5. Agitar vigorosamente a mistura e filtrar através de papel-filtro. A filtração é lenta, sendo necessário usar pequenas quantidades da mistura, com trocas diárias do filtro.

6. Estocar em frasco com tampa esmerilhada à temperatura de 4°C com data de expiração de três meses.

Preservação da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Uma gota do sedimento da amostra fecal é misturada com uma gota da albumina fixadora de Mayer para a preparação dos esfregaços permanentes.

3. Faulkner e Lillie[13] substituíram as claras por uma solução a 5% de ovos brancos secos em solução e cloreto de sódio a 5%, com agitação eventual, durante 24 horas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ash LR, Oriehl TC. Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. Chicago (Ill): ASCP Press, 1991.
2. Blagg W, Schloegel EI, Mansour NS et al. A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. Am J Trop Med Hyg 4:23-28, 1955.
3. Brooke MM, Goldman M. Polyvinyl alcohol-fixative as a preservative and adhesive for protozoa in dysenteric stools and other liquid materials. J Lab Clin Med 34:1554-1560, 1949.
4. Burrows RB. Microscopic Diagnosis of the Parasites of Man. New Haven: Yale University Press, 1965.
5. Burrows RB. Improved preparation of polyvinyl alcohol-$HgCl_2$, fixative used for fecal smears. Stain Technol 42:93-95, 1967.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

6. Burrows RB. A new fixative and technics for the diagnosis of intestinal parasites. Am J Clin Pathol 48:342-346, 1967.

7. Burrows RB. Other surface active agents for use the PAF sedimentation technic for intestinal parasites. Am J Clin Pathol 51:155-156, 1968.

8. Carroll MJ. Collection and Preservation of Fecal Specimens: Collection of Fresh Specimens. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, p.7.2.1.1-7.2.1.2. v.2. 1992.

9. Carroll MJ. Collection and Preservation of Fecal Specimens: Collection of Fresh Specimens. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, p.7.2.2.1-7.2.2.6. v.2. 1992.

10. Coutinho JO. Notas sôbre modificações do MIFC na consevação de fezes para pesquisa de cistos de protozoários. Arq Fac Hig S Paulo 10:65-70, 1956.

11. Current WL. Techniques and Laboratory Maintenance of *Cryptosporidium*. In: Dubey JP, Speer CA, Fayer R, eds. Cryptosporidiosis of man and animals. Boca Raton: CRC Press, p.31-58, 1990.

12. Dunn FL. The TIF direct smear as epidemiological tool with special reference to couting helminth eggs. Bull WHO 39:439-449, 1968.

13. Eberhard ML, Pieniazek NJ, Arrowood MJ. Laboratory diagnosis of *Cyclospora* infections. Arch Pathol Lab Med 212:792-797, 1997.

14. Faulkner RR, Lillie RD. Dried egg white for Mayer's albumin fixative. Stain Technol 20:99-100, 1945.

15. Garcia LS, Shimizu RY, Brewer TC et al. Evaluation of intestinal parasite morphology in polyvinyl alcohol preservative comparison of copper sulfate and mercuric chloride base for use in Schaudinn's fixative. J Clin Microbiol 17:1092-1095, 1983.

16. Garcia LS, Shimizu RY, Shum A et al. Evaluation of intestinal protozoan morphology in polyvinyl alcohol preservative comparison of zinc sulfate and mercuric chloride based compounds for use in Schaudinn's fixative. J Clin Microbiol 31:307-310, 1993.

17. Garcia LS, Bullock-Iacullo S, Palmer J et al. Diagnosis of parasitic infections: collections, processing and examination of specimens. In: Murray PR, ed. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington (DC): ASM Press, p.1145-1158, 1995.

18. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3nd ed. Washington (DC): ASM Press, 1997.

19. Herwaldt BL, Juranek DD. Protozoa and Helminths. In: Fleming DO, Richardson H, Tulis JI et al. (eds.). Laboratory Safety. Principles and Parctices. 2nd ed. Washington (DC): ASM Press, p.77-91, 1995.

20. Horen WP. Modification of Schaudinn fixative. J Clin Microbiol 13:204-205, 1981.

21. Junod C. Technique coprologique nouvelle essentiellement destinée a la concentration des trophozoites d'amibes. Bull Soc Pathol Exot Filiales 65:390-398, 1972.

22. Levine ND. Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man. 2nd ed. Minneapolis, Minn: Burgess Publishing Co., 1973.

23. Melvin DM, Brooke MM. Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites. 3rd ed. HHS publication No (CDC)82-8282. Atlanta:Laboratory Training and Consultation Division, Centers for Disease Control, 1982.

24. Pieniazek NJ, Slemenda SB, da Silva AJ et al. PCR confirmation of infection with *Cyclospora cayetanensis*. Emerging Infect Dis 2:342-343, 1996.

25. Price DL. Procedure Manual for Diagnosis of Intestinal Parasites. Boca Raton: CRC Press, 1993.

26. Rey L. Parasitologia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1991.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

27. Sapero JJ, Lawless DK. The MIF stain-preservation technique for the identification of intestinal protozoa. Am J Trop Med Hyg 2:613-619, 1942.

28. Sapero JJ, Lawless D, Strone CPAS. An improved iodine-staining technique for routine laboratory diagnosis of intestinal protozoa. Science 114:550-551, 1951.

29. Sawitz WG, Faust EC. The probability of detecting intestinal protozoa by successive stool examinations. Am J Trop Med 22:131-136, 1942.

30. Schaudinn F. Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden. Arb a d kaiserl Gesundhetsamte 19:47, 1903.

31. Smith JW, Fritsche TR. Selection an use of laboratory procedures for diagnosis of parasitic infections of gastrointestinal tract. In: Murray PR, Baron EJO, Pfaller MA et al. (eds.). Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington (DC): ASM Press, p.1141-1144, 1995.

32. Visvesvara GS, Moura H, Kovacs-Nace E et al. Uniform staining of *Cyclospora* oocysts in fecal smears by a modified safranin technique with microwave heating. J Clin Microbiol 35:730-733, 1997.

33. Yang J, Scholten T. A fixative for intestinal parasites permitting the use of concentration and permanent staining procedures. Am J Clin Pathol 67:300-304, 1977.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Capítulo 2



Exames Macroscópico e Microscópico da Amostra Fecal Fresca e Preservada

Geraldo Attilio De Carli

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A amostra fecal pode ser submetida ao diagnóstico laboratorial na forma de espécime fresco ou preservado. O espécime fresco oferece a oportunidade de exame e de avaliação macroscópica de todo o bolo fecal, enquanto o material preservado fornece somente informações do material submetido ao exame parasitológico. Quando a rotina padrão do laboratório é receber o espécime fecal preservado em vários preservadores, é aconselhável requisitar ao paciente uma pequena amostra não preservada para que a consistência das fezes possa ser estudada. O uso do micrômetro ocular deve ser uma prática padrão obrigatória no diagnóstico parasitológico. O tamanho é uma importante característica na identificação de ovos de helmintos, cistos e oocistos de protozoários.

Os métodos envolvem procedimentos diretos, como, por exemplo, exame direto a fresco para a pesquisa de ovos, larvas e cistos nas fezes; exame do sangue para a pesquisa de microfilárias ou coloração de esfregaços sangüíneos segundo Giemsa; as técnicas incluem condutas, reagentes e instrumentos, como, por exemplo, centrífugo-sedimentação pelo formaldeído-éter ou sedimentação espontânea. Dois pontos devem ser considerados na escolha de uma técnica para trabalhos de diagnóstico ou para programas de controle: 1.º) a técnica escolhida não necessita ser a mais exata entre as existentes, mas o

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

seu grau de confiança deve ser conhecido, tendo sido o mesmo determinado pelo pessoal técnico; 2.º) a escolha da técnica deve ser feita pelo pessoal do laboratório, considerando os critérios de exatidão e precisão. Inúmeros métodos e técnicas têm sido descritos e muitas modificações propostas. As modificações, na maioria das vezes, trazem excelentes resultados aos procedimentos originais, mas, com freqüência, elas simplesmente refletem preferências pessoais. Por esta razão, é essencial que os propósitos e os princípios que envolvem todos os passos de um procedimento sejam muito bem conhecidos e entendidos. O técnico deve estar familiarizado com vários métodos e técnicas, além de conhecer suas vantagens e desvantagens. Os procedimentos microscópicos incluem o exame direto a fresco de preparações, técnicas de concentração, colorações permanentes, técnicas de cultivo e métodos e técnicas especiais para certas infecções[7,11].

EXAME MACROSCÓPICO

As amostras fecais não preservadas devem ser examinadas macroscopicamente para determinar a consistência, o odor, a cor, a presença ou a ausência de sangue, de muco, de proglotes e de vermes adultos ou outras condições anormais. Conseqüentemente, o exame macroscópico deve sempre anteceder o exame microscópico. O material fecal varia quanto a sua consistência e, geralmente, é classificado em fezes formadas, semiformadas, pastosas ou líquidas (diarréicas). A Fig. 2.1 ilustra os estágios morfológicos dos protozoários intestinais, provavelmente como ocorrem em relação às várias categorias de consistência das fezes. Os trofozoítos são usualmente encon-

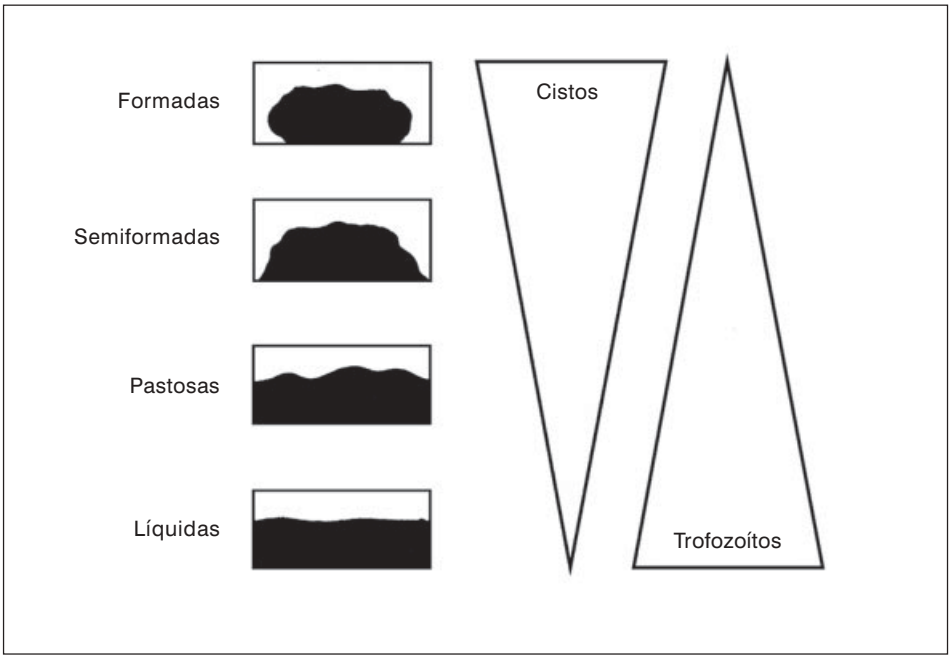


Fig. 2.1 — *Distribuição de cistos e trofozoítos em relação à consistência do material fecal. (Adaptada de Melvin DM, Brooke MM. Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites. 3rd ed. USDHHS PHS (CDC), 82-8282, 1982).*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

trados nas fezes líquidas, nas pastosas ou nas mucossanguinolentas, ao passo que os cistos são diagnosticados nas fezes formadas ou semiformadas. Os ovos e as larvas de helmintos podem estar presentes em todos os tipos de amostras fecais; entretanto, eles podem ser mais dificilmente encontrados em espécimes líquidos e, se presentes, em pequeno número. As formas móveis de protozoários se degeneram mais rapidamente do que as formas císticas; por esta razão, é de extrema importância que o estudo dos espécimes fecais seja realizado o mais rápido possível. A consistência das fezes não interfere na distribuição dos ovos e das larvas de helmintos, apesar de nas amostras líquidas haver uma diminuição relativa do número de ovos, devido ao fator de diluição. As fezes devem ser distribuídas no laboratório quanto a sua consistência. O material fecal líquido ou pastoso deve ser examinado primeiro, sendo seguido pelos espécimes semiformados e formados. Registrar a presença de sangue e muco nas amostras fecais, os quais podem indicar manifestações patológicas do trato gastrointestinal. O sangue oculto nas fezes pode estar relacionado com uma infecção parasitária, ou ser um resultado de outras condições anormais. A ingestão de diferentes produtos químicos, medicamentos ou alimentos pode atribuir às fezes colorações variadas. O exame macroscópico pode ser realizado pela simples observação ou pela tamização, as quais, em muitos casos, são suficientes para estabelecer um diagnóstico final.

Simples Observação

Examinar e revolver com bastão de vidro todo o material fecal evacuado. Anotar todas as características observadas e coletar os vermes adultos ou proglotes de tênias dejetadas. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento (Fig. 2.2).

Tamisação

Emulsionar as fezes com água e coar a emulsão com peneira metálica. Este procedimento deve ser realizado em uma pia utilizando-se um jato fraco de água corrente. Vermes adultos, como *Ascaris lumbricoides* e *Enterobius vermicularis*, são encontrados freqüentemente misturados ou na superfície das fezes, como também as proglotes de tênias. Outros helmintos, como o *Trichuris trichiura*, ancilostomídeos e *Hymenolepis nana*, são depositados no bolo fecal após o início do tratamento. Freqüentemente poderão ser encontrados helmintos adultos nas amostras fecais e ausência dos ovos. Esses procedimentos macroscópicos são vantajosos para a demonstração e colheita de pequenos helmintos, de proglotes e de escóleces. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento (Fig. 2.3).

IDENTIFICAÇÃO DE PROGLOTES DE *TAENIA* spp.

Três métodos são indicados para a identificação de proglotes de *Taenia*: o do ácido acético glacial, o de Campos e o da tinta da China.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

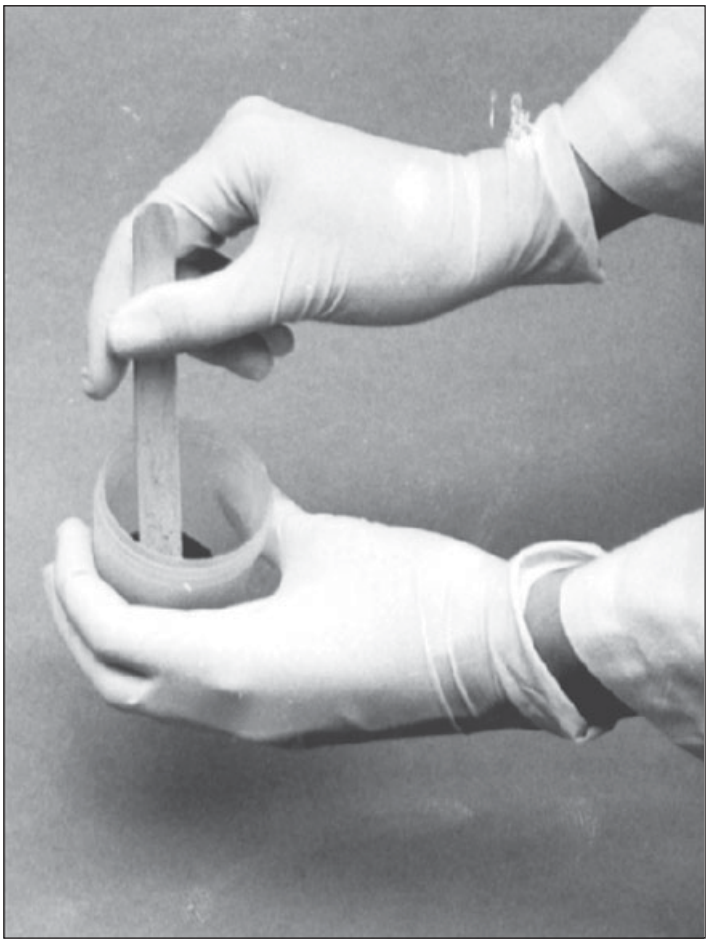


Fig. 2.2 — *Exame macroscópico pela simples observação.*



Fig. 2.3 — *Exame macroscópico pela tamisação.*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Método do Ácido Acético Glacial

Reagente

Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$).

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.
2. Colocar em uma placa de Petri, contendo ácido acético glacial, a proglote a ser identificada, durante 15 a 20 minutos.
3. Após este período, comprimi-la entre duas lâminas.
4. Examinar sob iluminação intensa.

Método de Campos[2]

Reagente

Comprimidos de metoquina.

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.
2. Dissolver três comprimidos de metoquina em 5ml de água destilada-deionizada.
3. Mergulhar nesta solução, durante 15 minutos, a proglote a ser identificada.
4. Após este período, comprimi-la entre duas lâminas.

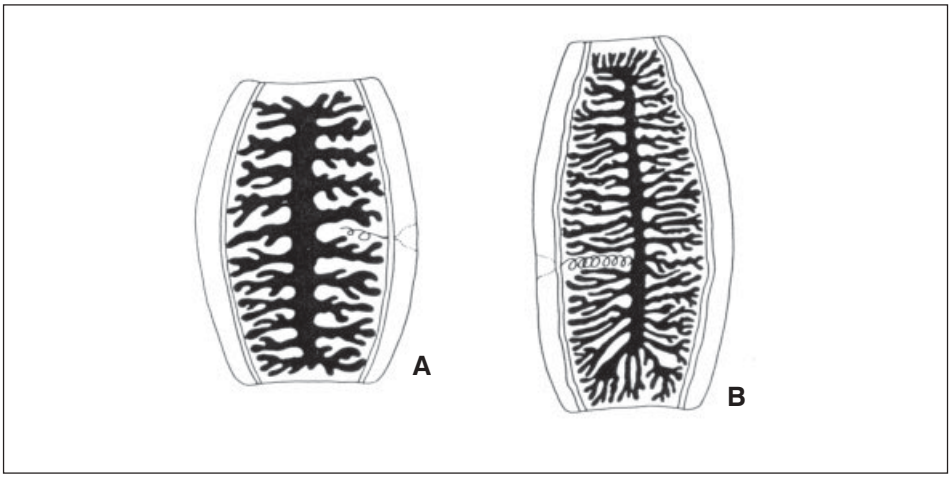


Fig. 2.4 — *Proglotes grávidas: (A)* Taenia solium*; (B*) Taenia saginata*.(Adaptada de Schell, S.C. Parasitology laboratory manual. New York: John Wiley & Sons, 1962).*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

5. Examinar sob iluminação intensa.

Método da Tinta da China[3]

A injeção de tinta da China (tinta nanquim) nas proglotes grávidas das tênias cora as ramificações uterinas mostrando as diferenças entre as tênias. A *T. solium* possui em média 9 (7 a 13) ramificações uterinas de cada lado do tronco central do útero (tipo dendrítico), enquanto a *T. saginata* apresenta em média 18 (15 a 20) ramificações uterinas (tipo dicotômico). Para as duas tênias, o diagnóstico é só genérico, pois microscopicamente os ovos são iguais. O diagnóstico específico requer a tamização de todo o bolo fecal, recolhimento das proglotes e a identificação pela morfologia das ramificações uterinas. A proglote corada pela tinta da China pode ser preservada indefinidamente em formaldeído a 10% (Fig. 2.4).

Reagentes

1. Tinta da China (tinta nanquim)
2. Seringa e agulha hipodérmica
3. Álcool etílico absoluto (C_2H_6O)
4. Álcool etílico a 50%, 70%, 90% (v/v)
5. Xilol (C_8H_{10}) ou toluol (C_7H_8)
6. Resina sintética

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colocar, durante várias horas, a proglote em água corrente fria (temperatura de geladeira) para o afrouxamento do segmento.

3. Secar a proglote (com tecido), colocando-a em uma lâmina de microscopia. Transportar o material com pinça. Injetar com seringa e agulha hipodérmica a tinta da China através do poro genital.

4. Lavar, rapidamente, em água corrente e secar a proglote, colocando-a entre duas lâminas de microscopia, comprimindo e amarrando as extremidades com linha (quando a proglote não estiver seca, ela escorrega para fora das lâminas).

5. Desidratar a proglote através de várias passagens em álcool (50%, 70%, 90% e álcool absoluto). Quando for necessário, o segmento pode ficar aproximadamente 24 horas no álcool a 70%.

6. Clarificar a proglote através de duas passagens em xilol ou toluol.

7. Montar com resina sintética (Cytoseal 60).

8. Examinar em microscópio de dissecação. Contar as ramificações uterinas.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

EXAME MICROSCÓPICO

O exame de esfregaços a fresco pelos métodos diretos é o método mais fácil e, talvez, o mais usado na rotina do laboratório, permitindo visualizar os estágios de diagnóstico dos protozoários (trofozoítos, cistos, oocistos e esporos) e dos helmintos (ovos, larvas e pequenos adultos). Para uma diagnose absoluta é necessário observar o parasito em um de seus estágios de evolução. O simples exame microscópico é, em muitos casos, suficiente para o diagnóstico. Entretanto, para a obtenção de melhores resultados será necessário o uso de técnicas de concentração, ou seja, processos mecânicos e/ou biológicos. O exame microscópico dos espécimes fecais pode requerer uma variedade de procedimentos, os quais dependem da consistência das amostras enviadas, do tipo de preservantes usados na fixação dos espécimes e dos sintomas clínicos ou queixas dos pacientes, que podem sugerir a presença de um determinado organismo (Tabela 2.1).

Pelos processos mecânicos, os elementos são concentrados por meio da centrifugação, baseados nas propriedades físicas, como a densidade dos ovos e cistos, aderência ao vidro etc. Nos processos biológicos, os parasitos são concentrados ativamente de acordo com seu tropismo (hidrotropismo, termotropismo e fototropismo). O exame microscópico das fezes, além de evidenciar os elementos fecais normais, pode revelar: a) ovos, larvas e pequenos adultos de helmintos intestinais; trofozoítos, cistos, oocistos e esporos de protozoários intestinais; b) hemácias (raramente encontradas, pois são lisadas com rapidez pelas enzimas digestivas; embora a presença indique uma ulceração ou problemas hemorrágicos); c) leucócitos (neutrófilos polimorfonucleares — podem ser indicativos de inflamação); d) eosinófilos (geralmente indicam a presença de uma resposta imune, que pode ou não ter relação com uma infecção parasitária); e) macrófagos (podem estar presentes em infecções bacterianas ou parasitárias); f) células epiteliais (resultam da descamação normal do trato intestinal); g) elementos inanimados como cristais de Charcot-Leyden (os quais podem ser encontrados pela desintegração de eosinófilos e podem ocasionalmente estar correlacionados com infecções parasitárias), cristais de oxalato de cálcio, cristais de fosfato amoníaco magnesiano e cristais de origem medicamentosa; h) fungos (*Candida* spp.), outras leveduras, células vegetais, grãos de pólen, esporos de fungos, fibras vegetais ou musculares, filamentos de raízes e pêlos de animais e i) ovos de artrópodes, de nematóides de plantas e de parasitos espúrios.

Tabela 2.1
Elaboração dos Espécimes Fecais

Consistência da Amostra Fecal	*Exame Direto a Fresco*	*Concentração para Protozoários*	*Coloração Permanente*	*Colorações Derivadas de Ziehl-Neelsen*
Formada	●	■	▲	▲
Semiformada	▲	■	■	▲
Pastosa	▲	■	■	▲
Líquida	▲	■	■	▲

Procedimentos: ● = desnecessário; ■ = recomendado; ▲ = ótimo.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Exame Direto a Fresco

O exame direto a fresco é um procedimento simples e eficiente para o estudo das fezes, permitindo observar os trofozoítos vivos dos protozoários. Este procedimento coprológico jamais deve ser omitido. As preparações a fresco são obtidas diretamente dos espécimes fecais e requerem o mínimo de material (2mg) para cada método de exame. Todos os estágios de diagnóstico dos organismos, pelo uso de diferentes soluções, podem ser determinados e identificados. Os esfregaços com fezes frescas e não fixadas são rotineiramente preparados com as soluções salina a 0,85% e de iodo (Fig. 2.6A). Entretanto, se o número de organismos for pequeno, o exame de pequena quantidade de fezes usada para a preparação de esfregaços a fresco pode ser insuficiente para revelar a presença de parasitos. Os esfregaços deverão ser sistemática e completamente examinados através da objetiva do microscópio de pequeno aumento (10X) e com pequena intensidade de luz. A confirmação dos parasitos deve ser realizada com a objetiva de grande aumento (40X) (Fig. 2.5). Quando forem usadas fezes preservadas, a formalina atua como diluente, não sendo necessário adicionar a solução salina a 0,85% às preparações de esfregaços sem coloração[25,55] (Fig. 2.6C). Colorações temporárias podem ser utilizadas com as preparações a fresco para auxiliar na localização e identificação de protozoários, sendo desnecessários esses corantes para a pesquisa de ovos e larvas de helmintos[15].

Preparações Salinas

Nas preparações sem coloração são pesquisadas a presença de cistos, ovos e larvas, e a motilidade dos trofozoítos, quando presentes. Entretanto, não é possível estabelecer um diagnóstico específico, no caso de formas trofozoíticas, com base em um exame direto a fresco e temporário, que tem somente um valor de orientação. Nesse caso as fezes deverão ser fixadas e um esfregaço fecal deverá ser preparado. Para pesquisa de ovos, o exame direto a fresco sem coloração oferece bons resultados, mas para a de cistos e de larvas é necessário preparar um esfregaço corado, tendo em vista o estudo das características morfológicas das diferentes espécies. O primeiro exame das amostras fecais deve ser feito por meio de esfregaços salinos. Nunca deve ser usada água corrente ou destilada, pois os trofozoítos são distorcidos, podendo ser deformados e rompidos. A solução salina a 0,85% e a solução de Ringer apresentam resultados satisfatórios na preparação dos esfregaços.

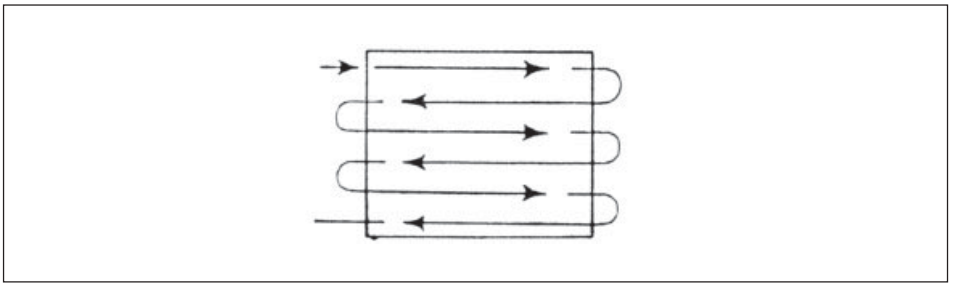


Fig. 2.5 — *Pesquisa sistemática e completa dos esfregaços a fresco.*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

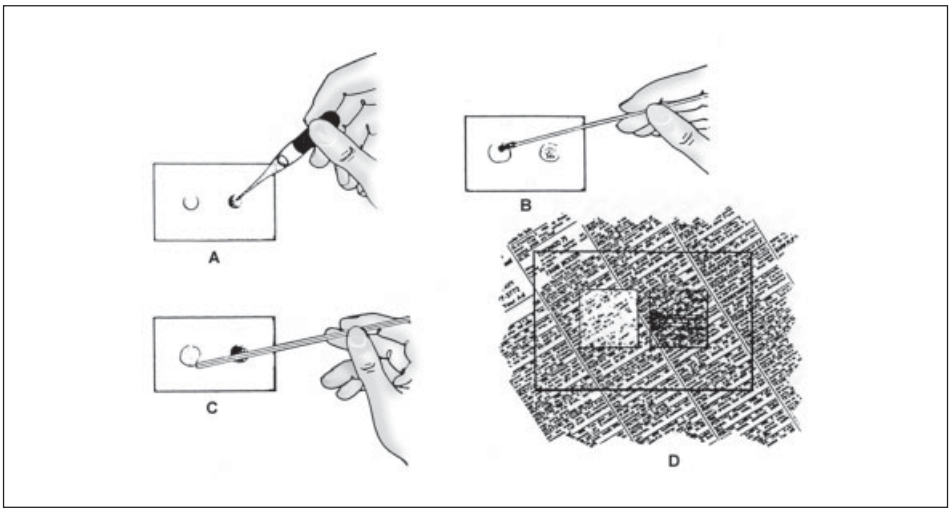


Fig. 2.6 — *Exame direto a fresco de amostras fecais. A) gota de solução salina 0,85% e iodo em uma lâmina; B) porção emulsificada de fezes não preservadas nos diluentes; C) gotas de suspensão fecal preservada; D) densidade correta da preparação. (Adaptada de Melvin DM, Brooke MM. Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites. 3rd ed. USDHHS PHS (CDC), 82-8282, 1982).*

Solução Salina a 0,85%

Cloreto de sódio (NaCl)	8,5g
Água destilada-deionizada	1.000ml

Solução de Ringer

Cloreto de sódio (NaCl)	8g
Cloreto de potássio (KCl)	0,2g
Cloreto de cálcio ($CaCl_2$)	0,2g
Cloreto de magnésio ($MgCl_2$)	0,1g
Diidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4)	0,1g
Hidrogenocarbonato de sódio ($NaHCO_3$)	0,4g
Água destilada-deionizada	1.000ml

• Dissolver os quatro primeiros componentes em 900ml de água destilada-deionizada e autoclavar (121°C/15min). Dissolver o diidrogenofosfato de sódio e o hidrogenocarbonato de sódio em 100ml de água destilada-deionizada e filtrar em *Seitz* ou *Millipore*. Misturar as duas soluções em condições de assepsia total.

Preparação dos Esfregaços Salinos

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.
2. O procedimento usual para preparar um esfregaço salino é colocar

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

uma ou duas gotas de solução salina a 0,85% em uma lâmina de microscopia (Fig. 2.6A).

3. Remover uma pequena porção de fezes do recipiente e emulsificar na salina, cobrindo a preparação com uma lamínula (Fig. 2.6B).

4. A suspensão não deve ser muito espessa, nem muito diluída; considera-se boa a suspensão que permite ler por transparência os caracteres comuns de um jornal (Fig. 2.6D).

5. Quando é encontrada uma fração de sangue e muco na superfície da amostra fecal, um novo esfregaço deve ser preparado e cuidadosamente examinado.

Observações

1. Ocasionalmente, estágios de alguns parasitos podem ser identificados em maior quantidade no sangue e no muco do que no restante da amostra; entretanto, todo o cuidado é necessário para não confundir leucócitos ou células epiteliais com amebas.

2. As preparações salinas apresentam duas importantes vantagens: 1.º) possibilitam o reconhecimento e a identificação dos organismos presentes e estabelecem a intensidade do parasitismo; e 2.º) servem como indicador para uma técnica a ser usada. As preparações salinas estão limitadas ao diagnóstico de praticamente todos os enteroparasitos e de alguns estágios de amebas. Contudo, a identificação e a diferenciação das amebas intestinais pelas preparações salinas é um processo de diagnóstico difícil e não satisfatório.

3. Quando cistos e trofozoítos de protozoários estiverem presentes deverão ser realizadas colorações temporárias específicas para cada estágio. Os ovos e as larvas são facilmente detectados e identificados nas preparações salinas. As formas císticas e trofozoíticas aparecem refringentes e os trofozoítos, se vivos, exibem características de locomoção.

4. Para evitar a dessecação na pesquisa de ovos e cistos, a solução salina pode ser substituída por água glicerinada (uma parte de glicerina + duas partes de água)[67].

5. Algumas estruturas, tais como corpos cromatóides nos cistos e eritrócitos nos trofozoítos, são vistas com mais facilidade nas preparações salinas do que através de colorações temporárias, enquanto os núcleos podem ser invisíveis.

O diagnóstico de laboratório diferencial entre a *Entamoeba histolytica* e a *Entamoeba dispar* não pode ser realizado tomando como base a morfologia (estudo de esfregaços fecais permanentes corados), a não ser que sejam vistas hemácias ingeridas pelos trofozoítos (*E. histolytica*)[30]. (A tendência moderna é voltar a concepção dualista, revalidando o nome E. dispar para a espécie não patogênica - Rey L. Dicionário de termos técnicos de Medicina e Saúde. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1999).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

6. Os protozoários intestinais nunca devem ser identificados tomando-se como referência somente uma preparação direta a fresco; esfregaços com colorações permanentes deverão ser examinados para que sejam estabelecidas a caracterização morfológica e a identificação específica do organismo em estudo (Tabela 2.2).

Controle de Qualidade (CQ): Esfregaços Salinos

1. A solução salina a 0,85% estocada em frasco de vidro com tampa esmerilhada deve ser transferida diariamente ao frasco conta-gotas e controlada para a presença de organismos de vida livre, especialmente flagelados e ciliados.

2. Procedimento usual para o CQ é colocar uma ou duas gotas da solução salina em uma lâmina de microscopia, cobrindo a preparação com uma lamínula.

3. A preparação deve ser examinada cuidadosamente ao microscópio. A contaminação pode resultar da acidental remoção de pequena porção de fezes durante a preparação da montagem salina.

4. Para evitar essa contaminação, colocar primeiro a solução salina na lâmina.

COLORAÇÕES TEMPORÁRIAS

Os ovos e as larvas de helmintos são facilmente diagnosticados pelo exame direto a fresco de esfregaços sem coloração, enquanto que os diferentes estágios dos protozoários são somente observados com o auxílio de diferentes colorações temporárias. Os núcleos dos trofozoítos das amebas, como os dos cistos, são indistinguíveis ou invisíveis no exame direto de esfregaços salinos. Várias soluções corantes são indicadas para a preparação e o exame de esfregaços a fresco pelos métodos diretos: as colorações

Tabela 2.2
Uso das Objetivas do Microscópio na Avaliação dos Parasitos nos Espécimes Fecais

Objetivas	*Exame Direto a Fresco para Ovos e Larvas*	*Exame Direto a Fresco para Protozoários*	*Coloração Permanente para Protozoário*
10X	Triagem	Triagem	Triagem
20X	Triagem		Triagem
	Triagem		
40X	Confirmação	Confirmação, a identificação pode requerer coloração permanente	Triagem
50X, imersão	Não é usada	Não é usada	Triagem
100X, imersão	Não é usada		Triagem detalhada e confirmação

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

para cistos, para trofozoítos e para cistos e trofozoítos de protozoários. As soluções de iodo recomendadas para corar cistos, são a de Lugol, de Dobell e O'Connor[23], de D'Antoni[20] e de Donaldson[24]. As soluções de iodo não são usadas na coloração dos estágios vegetativos, desde que todos os organismos são mortos e distorcidos pelo corante.

Diferentes colorações, como a de Quensel, descrita por Svensson[68]; de Velat, Weinstein e Otto[72] e a de Nair[57], são usadas na identificação de trofozoítos de amebas. Além dessas soluções corantes específicas para determinados estágios de protozoários, outras colorações temporárias são também empregadas para evidenciar cistos e trofozoítos. As soluções de Kohn[43], de Bucki, Wells e Vail[10] e de Sapero e Lawless[64] permitem corar, simultaneamente, quase todos os estágios dos protozoários intestinais. O estabelecimento da identidade morfológica das amebas, particularmente dos trofozoítos, não pode ser fixado através de colorações temporárias, conseqüentemente, são indicadas colorações permanentes, como a da hematoxilina férrica, segundo Heidenhain[34] ou do tricrômico de Wheatley[74], uma modificação da coloração de Gomori[32].

SOLUÇÕES DE IODO

As soluções de iodo são indicadas, principalmente, para a coloração de cistos, com o objetivo de determinar o número e a estrutura dos núcleos. A solução de iodo usada no método de Gram não é aconselhada para a coloração dos organismos parasitos. Os corantes não devem ser velhos, devendo apresentar uma correta intensidade de contraste. A solução de iodo muito concentrada é absorvida tão rapidamente, que os cistos tomam uma coloração marrom-escura uniforme. Entretanto, quando a concentração dessa solução é muito baixa, a solução não é suficientemente absorvida e os cistos tendem a harmonizar na sua periferia um matiz imperceptível junto a uma coloração de fundo amarelo-limão. Nos corantes velhos existe uma tendência de sublimação do iodo. Além disso, se uma gota do corante é colocada e deixada em uma lâmina de microscopia por longo tempo, antes de as fezes serem emulsificadas com a solução corante, o resultado é uma coloração irregular ou uma supracoloração.

Solução de Iodo de Lugol

Reagentes

1. Iodo, cristais (I_2).
2. Iodeto de potássio (KI).

Preparação da Solução

Iodo, cristais	5g

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Iodeto de potássio	10g
Água destilada-deionizada	100ml

• Dissolver 10g de iodeto de potássio em água. Adicionar lentamente 5g de cristais de iodo e agitar a mistura até a completa dissolução. Filtrar e estocar em frasco de cor âmbar com tampa esmerilhada, ao abrigo da luz. Preparar novas soluções depois de 10 a 14 dias. Antes do uso diluir na proporção de 1:5 em água destilada-deionizada. Indicar a data de validade no rótulo do frasco.

Solução de Iodo de Dobell e O'Connor

Reagentes

1. Iodo, cristais (I_2)
2. Iodeto de potássio (KI)

Preparação da Solução

Iodo, cristais	1g
Iodeto de potássio	2g
Água destilada-deionizada	100ml

• Dissolver 2g de iodeto de potássio em água. Adicionar lentamente 1g de cristais de iodo e agitar a mistura até a completa dissolução. Filtrar e estocar em frasco de cor âmbar com tampa esmerilhada, ao abrigo da luz. Preparar novas soluções depois de 10 a 14 dias. Indicar a data de validade no rótulo do frasco.

Solução de Iodo de D'Antoni Modificada

Reagentes

1. Iodo, cristais (I_2)
2. Iodeto de potássio (KI)

Preparação da Solução

Iodo, cristais	1,5g
Iodeto de potássio	1g
Água destilada-deionizada	100ml

• Dissolver 1g de iodeto de potássio em 100ml de água. Adicionar lentamente 1,5g de cristais de iodo e agitar a mistura até a completa dissolu-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

ção. Filtrar e estocar em frasco de cor âmbar com tampa esmerilhada, ao abrigo da luz. Preparar novas soluções depois de 10 a 14 dias. Indicar a data de validade no rótulo do frasco.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração. O procedimento usual para preparar um esfregaço corado é colocar uma ou duas gotas de uma das soluções de iodo em lâmina de microscopia (Fig. 2.6A).

2. Depois, remover pequena porção de fezes do recipiente e emulsificar no corante, cobrindo a preparação com uma lamínula (Fig. 2.6B).

3. A suspensão não deve ser muito espessa, nem muito diluída; considera-se boa a suspensão que permite ler por transparência os caracteres comuns de um jornal (Fig. 2.6D).

Características da Coloração: Soluções de Iodo

Nos cistos, corretamente corados, o glicogênio, se presente, exibe uma coloração castanho-avermelhada, o citoplasma cora-se em amarelo e a cromatina periférica dos núcleos, em preto ou marrom. As características dos núcleos são bem distintas, enquanto os corpos cromatóides são pouco visíveis.

Controle de Qualidade (CQ): Soluções de Iodo

1. Deve ser verificado diariamente se a solução de iodo está transparente e não contaminada por bactérias ou fungos. A solução de iodo deve apresentar cor marrom forte (de chá-da-índia ou de vinho do Porto), apresentando uma correta intensidade de contraste. Desprezar as soluções fracas. Evitar a contaminação do frasco conta-gotas.

2. Nos cistos dos protozoários, corretamente corados pela solução de iodo, o glicogênio, se presente, exibe uma coloração castanho-avermelhada, o citoplasma cora-se em amarelo e a cromatina periférica dos núcleos, em preto ou marrom. As características dos núcleos são bem distintas, enquanto os corpos cromatóides são pouco visíveis.

3. Leucócitos humanos misturados com fezes negativas podem ser usados como CQ da amostra fecal. Os leucócitos coram-se com a mesma coloração como são vistos os protozoários. O citoplasma dos leucócitos apresenta coloração amarelo-ouro.

4. Uma amostra sabidamente positiva também pode ser utilizada para CQ. A amostra para CQ deve ser examinada ao menos trimestralmente ou sempre que for preparado um novo corante.

5. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

6. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[15].

SOLUÇÃO DE QUENSEL

Este corante e os resultados obtidos foram descritos por Svensson[68] após a morte de Quensel[11]. Esta solução não cora os cistos, mas diferencia os núcleos dos trofozoítos de três gêneros de amebas: *Entamoeba*, *Iodamoeba* e *Endolimax*. O corante não é adequado para o estudo morfológico diferencial dos trofozoítos da *E. histolytica* e da *Entamoeba coli*. Esse método não cora os flagelados, incluindo a *Dientamoeba fragilis*, considerada até há bem pouco, como sendo um amebídeo (família Dientamoebidae e hoje pertencente à ordem Trichomonadida)[13,38]. Esta coloração favorece a diferenciação dos cistos vivos e dos trofozoítos redondos não fixados, já que aqueles não são corados por esta solução.

Reagentes

1. Sudan III, pó (CI 26100) ($C_{22}H_{16}N_4O$)
2. Álcool etílico a 80% (C_2H_6O) (v/v)
3. Azul-de-metileno, pó (CI 52015) ($C_{16}H_{18}ClN_3S.3H_2O$)
4. Cloreto de cádmio, pó ($CdCl_2$)

Preparação das Soluções

1. Soluções Estoques

a. Solução Alcoólica Saturada de Sudan III

Sudan III, pó	1,6g
Álcool etílico a 80%	100ml

• Adicionar o corante ao álcool. Agitar vigorosamente e deixar em repouso durante várias horas.

b. Solução Saturada Aquosa de Azul-de-metileno

Azul-de-metileno, pó	3,5g
Água destilada-deionizada	100ml

• Adicionar o corante à água. Agitar vigorosamente e deixar em repouso durante várias horas. Filtrar e estocar em frasco com rolha esmerilhada.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

c. Solução de Cloreto de Cádmio

Cloreto de cádmio, pó	10g
Água destilada-deionizada	100ml

• Dissolver os cristais de cloreto de cádmio em água. Filtrar e estocar em frasco com rolha esmerilhada.

2. Corante de Quensel

Solução alcoólica saturada de Sudan III	20ml
Solução aquosa saturada de azul-de-metileno	30ml
Solução de cloreto de cádmio	50ml

REVISÃO: EXAME DIRETO A FRESCO

Princípio: Avaliar a carga parasitária dos pacientes infectados proporcionando um diagnóstico rápido dos espécimes nas infecções maciças, permitindo observar os trofozoítos vivos dos protozoários.

Amostra: Espécimes fecais frescos que não tenham sido refrigerados.

Reagentes: Solução salina a 0,85%, solução de iodo de Lugol ou solução de iodo de D'Antonini.

Exame: Esfregaços com fezes frescas, não fixados, preparados com as soluções salina a 0,85% e de iodo. Examinar os esfregaços com pequeno aumento (100X) entre lâmina e lamínula (22 x 22mm); examinar com grande aumento (400X) no mínimo 1/3 da lamínula (preparações salinas e coradas pela solução de iodo).

Resultados: Os resultados devem ser considerados presuntivos; entretanto, alguns organismos são definitivamente diagnosticados (cistos de *Giardia lamblia* e *Entamoeba* spp., ovos e larvas de helmintos e oocistos de *Isospora belli*). Esses resultados são caracterizados como preliminares, até que o diagnóstico final esteja disponível após a realização das técnicas de concentração e do exame de preparações permanentes coradas.

Procedimento e Limitações: Quando a solução de iodo é adicionada às preparações, os organismos são mortos e perdem a motilidade, entretanto o núcleo dos cistos é realçado. O exame direto a fresco não é necessário para os espécimes colhidos com preservadores; usualmente é suficiente a concentração e o exame de esfregaços permanentes corados. O exame direto a fresco é normalmente examinado com pequeno aumento (100X) e com grande aumento (400X). Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Preparação do Corante

1. Misturar, sob agitação, 20ml da solução de Sudan III e 30ml da solução de azul-de-metileno. Filtrar esta mistura em frasco que já contenha 50ml da solução de cloreto de cádmio. Agitar, gentilmente, a mistura durante 15 a 20 minutos. Uma precipitação em flocos começa a se formar imediatamente e a solução torna-se quase incolor.

2. Filtrar e desprezar o filtrado. Remover o papel-filtro com o precipitado, espalhar o resíduo sobre outro pedaço de papel-filtro e deixar secar durante toda a noite.

3. Transferir o precipitado para outro papel-filtro e lavar com 20 a 30ml de água destilada-deionizada. Dissolver o precipitado lavado em 250ml de água destilada-deionizada. Se houver precipitação depois de vários dias, filtrar novamente a solução. Indicar a data de validade no rótulo do frasco.

Coloração da Amostra

Emulsificar as fezes diretamente no corante de Quensel, ou colocar uma gota de fezes emulsificada em solução salina a 0,85% em uma gota do corante, e misturar antes de colocar a lamínula sobre a preparação.

Características da Coloração

Depois de 10 a 20 minutos, o citoplasma dos trofozoítos das amebas cora-se em azul-claro e o núcleo em um matiz azul-escuro. O núcleo corado mostra as mesmas características morfológicas que apresenta nas preparações permanentes coradas pela hematoxilina. Após 30 a 60 minutos os organismos apresentam uma supracoloração e não são identificados. Os núcleos da *D. fragilis* são bem visíveis, apesar dessas estruturas não exibirem uma boa coloração. O corante de Quensel também pode ser usado com amostras conservadas pelo formaldeído; entretanto, os detalhes não são facilmente observados.

SOLUÇÃO TAMPONADA DE AZUL-DE-METILENO DE NAIR

Nair[57] mostrou que a solução corante tamponada de azul-de-metileno revela visivelmente as características nucleares dos estágios das formas trofozoíticas. Essa solução é eficaz em pH baixo, entre 3,6 e 4,8, permitindo uma penetração mais ativa do corante nos organismos. O pH das soluções corantes tem sido o fator decisivo na evidenciação das características morfológicas do núcleo dos trofozoítos de protozoários, por meio do exame de preparações a fresco. A solução tamponada de azul-de-metileno pode ser substituída pelo corante de Quensel[56]. Os resultados são os mesmos, contudo a solução de Nair é de mais fácil preparação.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Reagentes

1. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
2. Acetato de sódio ($NaC_2H_3O_2$)
   ou Acetato de sódio triidratado ($NaC_2H_3O_2.3H_2O$)
3. Azul-de-metileno (CI 52015) ($C_{16}H_{18}ClN_3S.3H_2O$)

Preparação das Soluções

Soluções Estoques

1. Solução I (Ácido Acético Glacial 0,2M)

Ácido acético glacial	12ml
Água destilada-deionizada	1.000ml

• Misturar ácido acético e água. Armazenar a solução até o momento do uso em frasco de vidro com tampa esmerilhada.

2. Solução II (Acetato de Sódio 0,2M)

Acetato de sódio, anidro	16,4g
ou	
Acetado de sódio, cristais	27,2g
Água destilada-deionizada	1.000ml

• Dissolver o acetato de sódio em 400ml de água. Completar o volume. Armazenar a solução até o momento do uso em um frasco de vidro com tampa esmerilhada.

3. Solução Tampão de Acetato 0,2M (Gomori)

Para obter o pH específico, misturar as quantidades indicadas de Soluções I e II 0,2M e diluir com água destilada-deionizada ao volume final de 100ml.

pH desejado	*Solução I* $C_2H_4O_2$ *0,2M*	*Solução II* $NaC_2H_3O_2$ *0,2M*
3,6	46,3ml	3,7ml
3,8	44,0ml	6,0ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

4,0	41,0ml	9,0ml
4,2	36,8ml	13,2ml
4,4	30,5ml	19,5ml
4,6	25,5ml	24,5ml
4,8	20,0ml	30,0ml

4. Solução Corante

• Dissolver 0,06g de azul-de-metileno em 100ml de solução tamponada de acetato pH 3,6. Melvin e Brooke[56] e Garcia e Bruckner[29,30] relatam resultados satisfatórios nesse pH.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.

2. Emulsificar uma pequena quantidade de fezes (2mg) ou o sedimento de uma cultura em uma a duas gotas da solução tamponada de azul-de-metileno em lâmina de microscopia.

3. Cobrir a preparação com uma lamínula e examinar.

Características da Coloração

Após cinco a 10 minutos, o citoplasma dos trofozoítos das amebas cora-se em azul-claro e o núcleo em azul-escuro. O núcleo corado apresenta as mesmas características morfológicas observadas nas colorações permanentes pela hematoxilina férrica.

Controle de Qualidade (CQ): Exame Direto a Fresco

1. Deve ser verificado diariamente se a solução salina a 0,85%, a solução de iodo e a solução de azul-de-metileno de Nair estão transparentes e não contaminadas por bactérias ou fungos.

2. A solução de iodo deve apresentar cor marrom forte do chá-da-índia ou do vinho do Porto, mostrando uma correta intensidade de contraste. Desprezar as soluções fracas.

3. Nos cistos dos protozoários, corretamente corados pela solução de iodo, o glicogênio, se presente, exibe uma coloração castanho-avermelhada, o citoplasma cora-se em amarelo e a cromatina periférica dos núcleos, em preto ou marrom. As características dos núcleos são bem distintas e os corpos cromatóides são pouco visíveis.

4. Leucócitos humanos misturados com fezes negativas podem ser usados como CQ da amostra fecal. Os leucócitos coram-se com a mesma coloração como são vistos os protozoários. O citoplasma dos leucócitos apresenta coloração amarelo-ouro.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

5. Pela solução tamponada de azul-de-metileno o citoplasma dos trofozoítos das amebas cora-se em azul-claro e o núcleo, em azul-escuro. O núcleo corado apresenta as mesmas características morfológicas observadas nas colorações permanentes pela hematoxilina férrica.

6. Uma amostra sabidamente positiva também pode ser utilizada para CQ. A amostra para CQ deve ser examinada ao menos trimestralmente ou sempre que for preparado um novo corante.

7. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

8. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário seguir o plano de ação para resultados "fora de controle".

SOLUÇÃO DE MERTIOLATO-IODO-FORMALDEÍDO (MIF)

A solução corante-fixadora de mertiolato-iodo-formaldeído (MIF) foi introduzida por Sapero, Lawless e Strone[63] e Sapero e Lawless[64]. A solução MIF permite a coloração de cistos e trofozoítos de protozoários pelo exame direto a fresco e de ovos e larvas de helmintos encontrados nas fezes.

Reagentes

1. Formaldeído 37-40% (HCHO)
2. Solução de iodo de Lugol (ver p. 38)
3. Tintura de Merthiolate (timerasol), n.º 99, 1:1.000 (Lilly)
4. Cloreto de sódio (NaCl)

Preparação das Soluções

1. Solução Corante-Conservadora MIF

Solução de iodo de Lugol	1ml
Formaldeído 37-40%	1,5ml
Tintura de Merthiolato, 1:1.000	7,5ml

• 1ml do corante é suficiente para a coloração de 25 a 30 preparações. O corante-fixador deve ser preparado fresco diariamente.

2. Solução Salina Isotônica (0,15M)

Cloreto de sódio	8,767g
Água destilada-deionizada	1.000ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

• Dissolver o NaCl em uma pequena quantidade de água, completando após o volume.

Coloração da Amostra (exame direto a fresco)

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.

2. Colocar em uma das extremidades da lâmina de microscopia uma ou duas gotas de solução salina isotônica (0,15M) e uma gota de igual volume do corante-fixador MIF.

3. Emulsificar uma pequena quantidade de fezes frescas na solução salina isotônica (0,15M) e a outra, no corante-fixador MIF.

4. Cobrir cada uma das preparações com uma lamínula e examinar. A lamínula pode ser examinada algumas horas após sem perdas na coloração ou das características morfológicas.

Características da Coloração

As reações de coloração no exame direto, como também nas amostras preservadas, são divididas em duas fases: 1.ª) fase do iodo, na qual os trofozoítos e os cistos se coram de verde-amarelo ou de marrom-amarelo; 2.ª) fase da eosina, a qual é permanente e substitui a do iodo. Na fase do iodo, o núcleo cora-se de marrom-escuro e na fase da eosina, de vermelho-escuro ao preto. O citoplasma dos trofozoítos e dos cistos muda do verde-amarelo ou marrom na fase do iodo, para a cor da eosina (rosa ou vermelha) na segunda fase. Os elementos nucleares de todas as espécies, com exceção da *Dientamoeba*, são muito bem definidos. O glicogênio aparece como uma área marrom-escura na fase do iodo e uma área sem cor na fase da eosina. Os corpos cromatóides são característicos em sua aparência. Os flagelos são observados nos trofozoítos dos protozoários flagelados. Os ovos de helmintos são também corados e mantêm suas características normais. Os detritos fecais coram-se em marrom-escuro mais do que os parasitos, o sangue e os tecidos celulares. Não ocorre deformação dos organismos, mas para melhor contraste, um filtro azul deverá ser usado no sistema de iluminação[56].

EXAME DIRETO PARA A PESQUISA DE OVOS DE HELMINTOS

Método do Esfregaço Espesso de Celofane

Nesse método, desenvolvido por Kato e Miura[42], um pedaço de celofane substitui a lamínula de vidro. É recomendado para inquéritos coprológicos, por ser rápida e simples a preparação dos esfregaços fecais e pelo baixo custo na pesquisa de ovos de helmintos (Fig. 2.7).

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

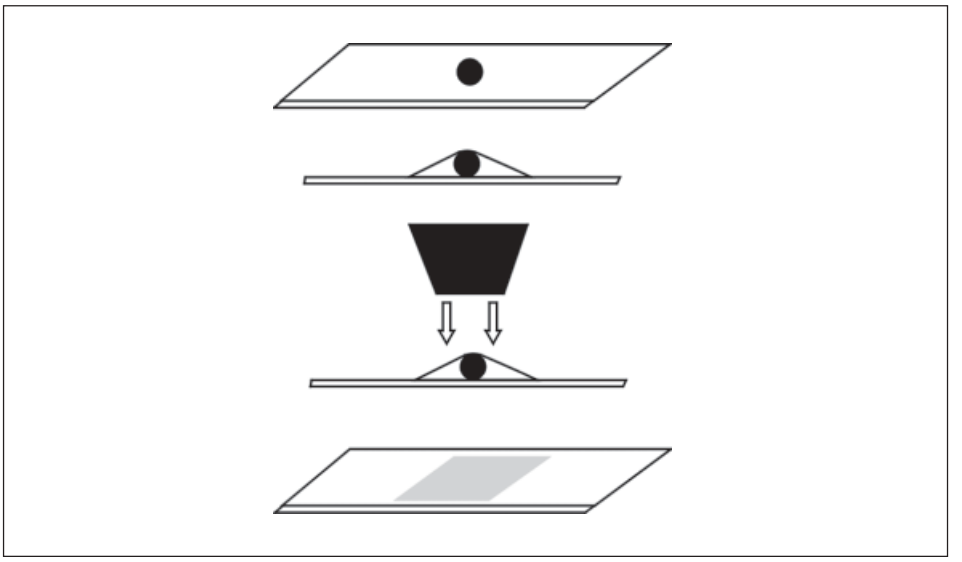


Fig. 2.7 — *Método de Kato e Miura (esfregaço espesso de celofane).*

Reagentes e Materiais

1. Verde de malaquita (CI 4200) $(C_{23}H_{25}N_2)_2.3C_2H_2O_4$
2. Fenol fundido a 44°C (C_6H_6O)
3. Glicerina ($C_3H_8O_3$)
4. Lamínulas de celofane de 40mm de espessura e 26 x 28mm de tamanho

Preparação do Corante e das Lamínulas

1. Solução de Verde de Malaquita

Solução aquosa de verde de malaquita a 3%	1ml
Solução aquosa de fenol a 6%	100ml
Glicerina	100ml

• Embeber por mais de 24 horas, individualmente, as lamínulas de celofane no corante.

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colocar 60 a 70mg de fezes frescas (tamanho de um grão de feijão-preto) em uma lâmina de microscopia.

3. Cobrir as fezes com a lamínula de celofane após a remoção do excesso do corante.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

4. Comprimir a lamínula, com uma rolha de borracha macia, e espalhar o material com uniformidade até as margens da cobertura de celofane.

5. Examinar ao microscópio.

Observações

1. Os ovos poderão romper-se pelo excesso de pressão sobre a lamínula de celofane[44].

2. Esses estágios de diagnóstico são detectados com mais eficiência quando a preparação é deixada em repouso durante 30 a 60 minutos à temperatura de 25°C com umidade relativa de 75%, ou 20 a 30 minutos na estufa a 40°C. Essa temperatura mantém as fezes secas e claras, enquanto os ovos conservam sua morfologia normal[65]. Durante o verão ou em regiões tropicais, provavelmente devido a uma supracoloração, poderá haver uma deformação dos ovos na preparação[45,54]. A glicerina torna opaca as preparações.

3. Alguns ovos observados nos esfregaços preparados por este método mostram morfologia bastante diferente daqueles identificados nos esfregaços salinos. As membranas finas dos ovos dos ancilostomídeos e dos *Trichostrongylus orientalis* são vistas achatadas e arredondadas. Os ovos de *Ascaris* e *Enterobius* não apresentam qualquer deformação morfológica das membranas em ambas as preparações.

4. Com muita freqüência é impossível, pelo método de Kato e Miura[42], a identificação específica dos pequenos ovos de trematódeos, como *Metagonimus yokogawai* e *Clonorchis sinensis*, devido à indistinguível morfologia do opérculo e sua injunção com a membrana.

5. A intensidade de luz necessária durante o exame microscópico desse método é no mínimo duas vezes maior do que a requerida pelo exame direto a fresco, por esta razão o verde de malaquita é usado para propiciar proteção aos olhos[65].

TÉCNICAS DE CONCENTRAÇÃO

As técnicas de concentração figuram entre os procedimentos de rotina, como parte de um exame completo das fezes, para a pesquisa de parasitos e o diagnóstico de um pequeno número de organismos que foram omitidos, quando foi usado somente o exame direto a fresco. Os três principais objetivos dessas técnicas são: 1) aumentar o número de cistos, oocistos, ovos ou larvas na preparação; 2) eliminar a maioria dos detritos fecais; e 3) apresentar os organismos em um estado inalterado, facilitando sua identificação. Essas técnicas são indicadas para separar os cistos e oocistos de protozoários e ovos de helmintos do excesso de detritos fecais através de diferenças específicas de densidade[26]. As técnicas de concentração se dividem em: flutuação e sedimentação, e cada uma destas se subdivide em flutuação simples e centrífugo-flutuação; sedimentação simples e centrífugo-sedimentação.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Técnicas de Flutuação

As técnicas de flutuação fundamentam-se no princípio da diferença de densidade específica entre os ovos de helmintos, cistos e oocistos de protozoários e o material fecal, a fim de que esses organismos flutuem na superfície dos reagentes com densidade específica[67]. Esse processo de concentração foi introduzido por Bass[6] para recuperar ovos de ancilostomídeos nas fezes. Os procedimentos de flutuação usam reagentes de alta densidade para a concentração dos ovos, cistos e oocistos de parasitos. Os ovos e cistos usualmente apresentam uma densidade específica que varia de 1,05 a 1,15g/ml; entretanto alguns ovos, como de *Clonorchis* e *Opisthorchis* e outras espécies muito próximas, mostram uma densidade específica superior a 1,20g/ml e não podem ser concentrados pelas técnicas usuais de flutuação[27]. As principais vantagens apresentadas pela flutuação são a formação na superfície do tubo de uma membrana clara com poucos detritos fecais e a remoção seletiva de ovos e cistos, mesmo quando presentes em pequeno número no bolo fecal, resultando em quantidade maior de organismos de certas espécies, quando comparado com o número de parasitos presentes nos esfregaços salinos. A alta densidade dos reagentes é a mais significativa desvantagem dos procedimentos de flutuação. A parede dos ovos e dos cistos, com muita freqüência, entra em colapso e os parasitos tornam-se distorcidos na aparência, dificultando a identificação. Por essa razão, as membranas deverão ser colhidas e examinadas dentro de um período de 10 a 20 minutos.

A densidade específica da maioria dos ovos, cistos e oocistos é desconhecida. Esse fato provavelmente determinou o uso de diversas soluções, cada uma com diferentes densidades específicas, com o objetivo de recuperar na preparação todos os ovos não operculados e cistos. Os trofozoítos e os ovos operculados não são isolados através dessa técnica; flutuam somente os pequenos ovos de trematódeos, como o *Clonorchis* e o *Heterophyes*. Ovos pesados, como os de *Ascaris*, *Taenia*, *Schistosoma*, *Fasciola* e *Fasciolopis*, não flutuam; alguns cistos delicados e as larvas são distorcidos. As gorduras e os óleos presentes nas fezes flutuam com os ovos e cistos, tornando a preparação algumas vezes insatisfatória para o exame.

Nas técnicas de flutuação são usadas principalmente as soluções saturadas de cloreto de sódio[75], de sacarose[66], de sulfato de zinco[26,27,59] e de sulfato de magnésio[60]. A densidade específica dessas soluções saturadas variam de 1,18 a 1,26g/ml.

Flutuação em Solução Saturada de Cloreto de Sódio

A técnica de Willis[75] fundamenta-se na dupla propriedade que apresentam certos ovos de helmintos de flutuarem na superfície de uma solução de densidade elevada e de aderirem ao vidro[46]. Este procedimento, simples e eficiente, está indicado para a pesquisa de ovos com densidade específica baixa, como os de ancilostomídeos e de *Trichostrongylus orientalis*, embora não seja recomendado para os ovos pesados de trematódeos, ovos de *E.*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

vermicularis e ovos inférteis de *A. lumbricoides*. Os cistos de protozoários se retraem, ficando irreconhecíveis.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas).

Reagente

Cloreto de sódio (NaCl).

Preparação da Solução

Solução Saturada de Cloreto de Sódio, Densidade 1,20g/ml

A solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) com densidade específica de 1,20g/ml é preparada pela adição do NaCl em água destilada-deionizada ou corrente quente ou em ebulição, até que o excesso acrescentado não mais se dissolva na solução, (aproximadamente 40g de NaCl em 100ml de água)[67]. A densidade específica é crítica, devendo-se usar um densitômetro para controlar e ajustar a solução. Filtrar em papel-filtro.

Técnica

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colocar uma quantidade de fezes frescas de aproximadamente 1 a 2g, coletada de várias partes do bolo fecal, em pequena cuba de vidro de 3cm de diâmetro com capacidade aproximada de 20ml. Completar 1/4 da capacidade do recipiente com solução saturada de cloreto de sódio.

3. Suspender as fezes na solução saturada salina até haver uma total homogeneização.

4. Completar o volume. Colocar uma lamínula (22 x 22mm) ou uma lâmina sobre a borda da pequena cuba.

5. A lamínula deve ficar em contato com o menisco durante 30 a 45 minutos; não deverá haver formação de bolhas de ar entre a lamínula e a superfície do líquido. A gota contendo os ovos se adere à face inferior da lamínula (Fig. 2.8).

6. Remover a lamínula e inverter rapidamente sua posição sobre uma lâmina. Examinar ao microscópio com objetiva de pequeno aumento.

Observações

1. Os ovos não flutuam na superfície do reagente quando a homogeneização do material fecal é incompleta, havendo uma imperfeita separação dos ovos e dos detritos fecais.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

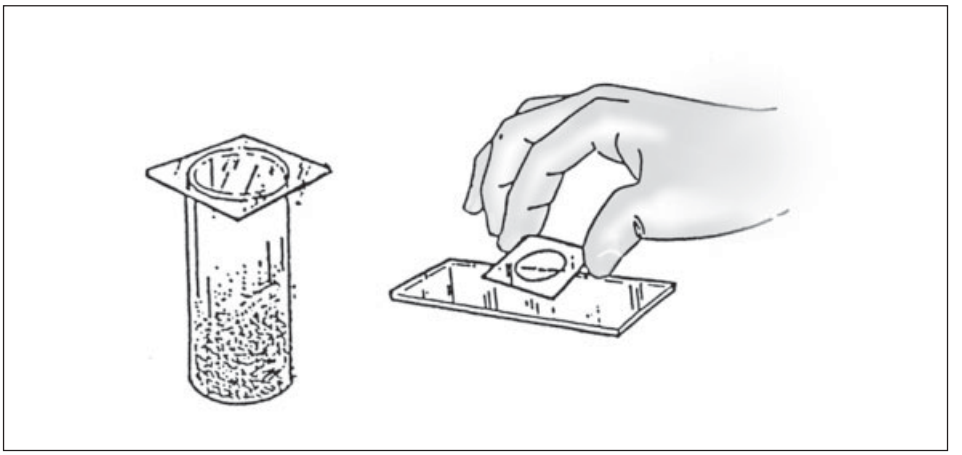


Fig. 2.8 — *Flutuação em solução concentrada de cloreto de sódio. (Adaptada de Markell EK, Voge M, John DT. Medical Parasitology. 7th ed. Philadelphia (Pa): WB Saunders Co., 1992).*

2. A flutuação dos ovos não se realiza quando o período de flutuação é muito curto (menos de 30 minutos) ou muito longo (mais de 60 minutos). Nesse caso os ovos que flutuam na superfície podem descer para o fundo da pequena cuba[52,67].

Flutuação em Solução de Sulfato de Zinco

A técnica de Willis[75] foi modificada por Faust e cols.[27] e por Otto, Hewitt e Strahan[59], na qual a solução saturada de cloreto de sódio, de densidade 1,20g/ml, foi substituída pela solução de sulfato de zinco com densidade de 1,18g/ml.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas).

Reagente

Sulfato de zinco, cristais ($ZnSO_4$).

Preparação da Solução

Solução de Sulfato de Zinco, Densidade 1,18g/ml

Sulfato de zinco, cristais	330g
Água destilada-deionizada	670ml

• A densidade é crítica, devendo ser ajustada com densitômetro pela adição de sal ou de água. Filtrar em papel-filtro. Burrows[11] e Suzuki[67] dis-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

solvem 371g de $ZnSO_4$ em 1.000ml de água; Ash e Orihel[3] e Garcia e Bruckner[29,30] aconselham 330g de $ZnSO_4$ em 670ml de água.

Técnica

Seguir o mesmo procedimento preconizado na técnica da solução saturada de cloreto de sódio[75], substituindo o NaCl pelo $ZnSO_4$.

Flutuação em Solução de Sulfato de Magnésio

Na técnica de Phillipson[60] o reagente de flutuação usado é composto por sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e cloreto de sódio (NaCl). Essa solução saturada de alta densidade possibilita a flutuação dos ovos pesados.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas).

Reagentes

1. Sulfato de magnésio ($MgSO_4$)
2. Cloreto de sódio (NaCl)

Preparação da Solução

1. Solução de Sulfato de Magnésio e Cloreto de Sódio

Cloreto de sódio, cristais (NaCl)	290g
Sulfato de magnésio, cristais ($MgSO_4$)	185g
Água destilada-deionizada	1.000ml

• Dissolver o NaCl e o $MgSO_4$ em água quente. Agitar vigorosamente e filtrar em papel-filtro.

Técnica

Seguir o preconizado na técnica Willis[75], substituindo a solução saturada de cloreto de sódio pela solução $MgSO_4$-NaCl.

Centrífugo-Flutuação em Solução de Sulfato de Zinco

A técnica de Faust e cols.[26] foi o primeiro procedimento desenvolvido para o diagnóstico de cistos de protozoários e de ovos e larvas de helmintos.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Ovos grandes de trematódeos, de cestóides e inférteis de *A. lumbricoides* não são concentrados. Essa técnica é imprópria para espécimes fecais que contenham grande quantidade de gorduras. A solução de sulfato de zinco é preparada na densidade de 1,18g/ml para fezes frescas. A técnica pode ser usada com fezes preservadas em formaldeído (5% ou 10%, tamponado ou não tamponado), SAF e fixador APV; entretanto, a densidade específica deverá ser ajustada em 1,20g/ml. O aumento da densidade poderá resultar em uma distorção adicional dos organismos[11,17,29,30,33].

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas).

Reagente

Sulfato de zinco ($ZnSO_4$).

Preparação da Solução

1. Solução de Sulfato de Zinco, Densidade 1,18g/ml

Preparação (v. p. 52). Uma solução a 33% (m/v) usualmente se aproxima da densidade correta.

Técnica

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colocar 1 ou 2g de fezes frescas colhidas de várias partes do bolo fecal em frasco contendo 10ml de água corrente. Filtrar a suspensão através de gaze, levemente umedecida em água corrente, dobrada duas vezes, e receber o filtrado em um tubo de centrífuga de 15ml com fundo redondo. A suspensão pode ser filtrada através de filtro descartável (Parasitofiltro®), com alça de segurança, levemente umedecido em água corrente.

3. Adicionar água corrente até completar 2/3 da capacidade do tubo.

4. Centrifugar (650 x *g*/1min). Decantar o sobrenadante e adicionar 1 a 2ml de água corrente ao sedimento, antes de ressuspendê-lo. Completar com água corrente 2/3 do volume do tubo, agitar e centrifugar.

5. Repetir a etapa 3, até que o sobrenadante apresente-se relativamente claro.

6. Depois que o último sobrenadante é decantado, adicionar 1 a 2ml do reagente e ressuspender o sedimento; completar com sulfato de zinco até 0,5cm da borda do tubo e centrifugar (650 x *g*/1min).

7. Cuidadosamente, remover o tubo da centrífuga e, sem agitação, colocá-lo em uma estante em posição vertical.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

8. Com uma alça de arame (diâmetro de 5 a 7mm) tocar no centro da membrana formada na superfície, transferindo várias alçadas para uma lâmina de microscopia. Pesquisar ovos, larvas e cistos (Fig. 2.9B).

9. Alguns pesquisadores preferem a sobreposição de uma lamínula na borda do tubo à remoção da película com alça de arame (11,56). Depois de concluída a etapa 4, com auxílio de pipeta, encher o tubo até a borda com solução de sulfato de zinco. Colocar uma lamínula (22 x 22mm) na superfície do tubo, deixando-a em contato com o líquido durante oito a 10 minutos. Remover a lamínula, invertendo sua posição e colocar a face com a gota sobre uma lâmina. Examinar para ovos, larvas e cistos (Fig. 2.9A).

Amostra

Material fecal preservado pela solução de formaldeído a 10%.

O material fecal preservado com solução de formaldeído requer uma alta densidade específica para que os ovos, larvas e cistos flutuem. Dessa

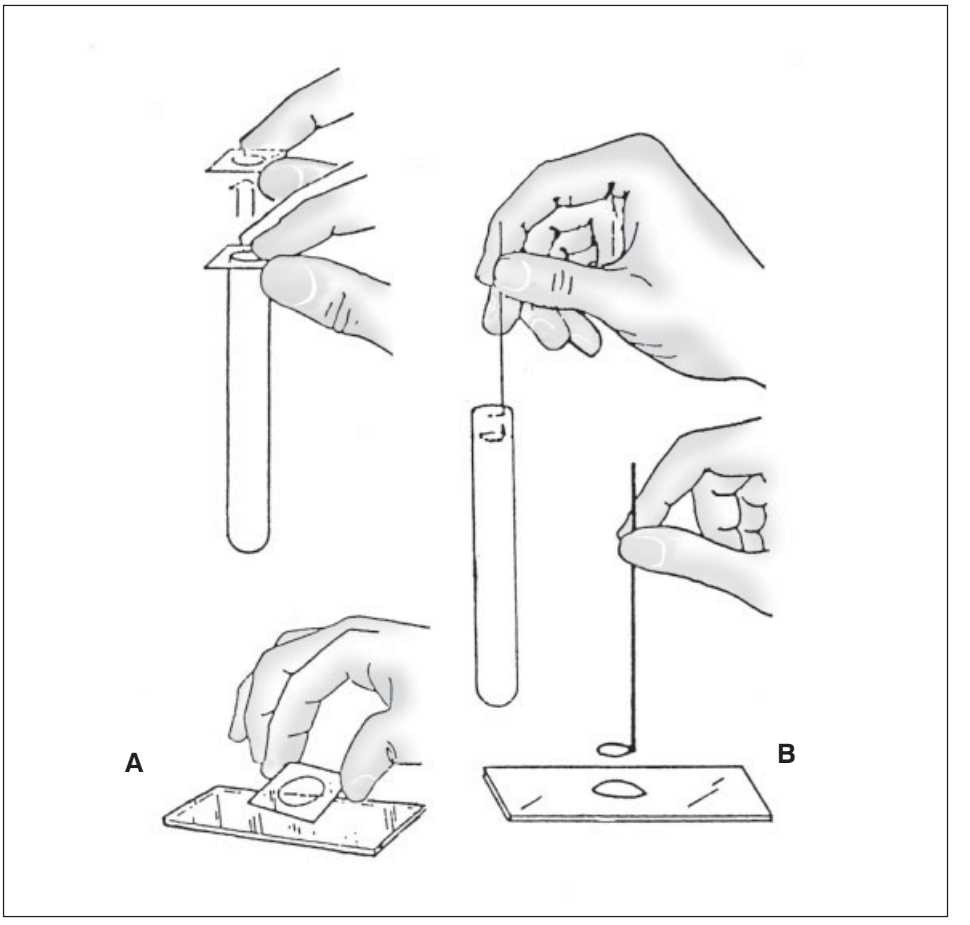


Fig. 2.9 — *Flutuação em solução de sulfato de zinco. A) Técnica da lamínula; B) Técnica da alça de arame. (Adaptada de Melvin DM, Brooke MM. Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites. 3rd ed. USDHHS PHS (CDC), 82-8282, 1982).*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

maneira deverá ser usada uma solução de sulfato de zinco com densidade de 1,20g/ml. A técnica do sulfato de zinco para espécimes fecais preservados pelo formaldeído foi descrita por Barlett e col.[5].

Reagentes

1. Sulfato de zinco ($ZnSO_4$)
2. Solução de formaldeído a 10% (ver p. 9)

Preparação da Solução

Solução de Sulfato de Zinco, Densidade 1,20g/ml

Sulfato de zinco, cristais ($ZnSO_4$)	400g
Água destilada-deionizada	600ml

• Ajustar a densidade em 1,20g/ml com densitômetro, pela adição do sal ou água.

Técnica

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. A suspensão fecal formolizada deverá ser aproximadamente uma parte de fezes para duas a três partes de solução de formaldeído. Se a suspensão for muito espessa, diluir com solução de formaldeído a 10% para se aproximar da proporção.

3. Filtrar a suspensão fecal formolizada através de gaze, levemente umedecida em água corrente, dobrada duas vezes, de modo a obter 3/4 de um tubo de 13 x 100mm. Adicionar ao tubo, se necessário, água corrente. A suspensão pode ser filtrada através do filtro descartável (Parasitofiltro®) com alça de segurança, levemente umedecido em água corrente.

4. Seguir as etapas de 2 a 8, como foi descrito para o material fecal não preservado, usando sulfato de zinco de densidade 1,20g/ml.

Observações

1. Alguns ovos de trematódeos e de cestóides podem estar presentes em um exame completo; deverão ser examinados a membrana e o sedimento.

2. Uma permanência prolongada da suspensão de fezes na solução de sulfato de zinco, de alta densidade específica, pode resultar em colapso e distorção dos cistos e dos ovos de nematóides com parede fina. Examinar a preparação após 20 minutos.

3. Não usar gaze com mais de duas camadas de espessura; gaze mais espessa pode reter o muco (contendo oocistos de *Cryptosporidium* e de *Cyclospora* e/ou esporos de microsporídios)[30].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

4. Tubo com fundo redondo é mais apropriado do que tubo cônico de centrífuga de 15ml.

5. A água corrente poderá ser substituída pela solução salina a 0,85% durante todo o procedimento, conquanto a adição de água às fezes frescas causa a ruptura dos cistos de *Blastocystis hominis* (corpo central). Alguns autores preferem o uso de formalina a 5% e 10% em substituição à água corrente em todas as etapas da lavagem. Com os espécimes preservados com SAF a técnica deve iniciar na etapa 2.

6. Examinar a membrana e o sedimento quando a centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco for a única técnica de concentração usada para o diagnóstico, assegurando, dessa maneira, a detecção de todos os organismos[30].

Controle de Qualidade (CQ): Técnicas de Flutuação

1. Verificar os reagentes sempre que forem usados. A solução salina e a solução de sulfato de zinco devem apresentar aparência clara sem contaminação visível.

2. Trimestralmente ou sempre que a centrífuga for calibrada, amostras fecais sabidamente positivas devem ser concentradas e os organismos identificados.

3. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

4. A densidade da solução de sulfato de zinco é crítica, devendo ser ajustada com densitômetro pela adição de sal ou água.

5. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[17,30].

Técnicas de Sedimentação

Os dois principais objetivos das técnicas de sedimentação são o aumento do número de ovos operculados, não operculados, larvas ou cistos e a separação das gorduras e óleos da maioria dos detritos. Nessas técnicas, os organismos são sedimentados igualmente pela gravidade ou centrifugação. A sedimentação apresenta uma ação inversa, comparada com a flutuação. Os cistos, oocistos, ovos e larvas são retidos no fundo do tubo, enquanto os detritos são suspensos para a superfície, não interferindo no diagnóstico final. A maior desvantagem é a grande quantidade de detritos fecais no sedimento, tornando a identificação dos organismos muito mais difícil do que pelos procedimentos de flutuação. Algumas técnicas de sedimentação usam o éter etílico e soluções de ácido clorídrico, ácido acético, ou sulfato de sódio para clarificar e liberar os organismos dos detritos fecais. O éter poderia conduzir muitos ovos e cistos junto com os detritos, dificultando o diagnóstico das infecções leves. As soluções de ácidos fortes podem deformar ovos e cistos.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

As técnicas de sedimentação foram desenvolvidas para o diagnóstico das enteroparasitoses, como a de Teleman (ácido clorídrico-éter)[69]; Lutz (água corrente)[49]; de Rivas (ácido acético-éter)[22]; Tomb e Helmy (solução salina a 0,7%)[70]; Hoffman, Pons e Janer (água corrente)[37]; Faust, Ingalls e See (água glicerinada a 0,5%)[28]; Jahnes e Hodges (solução de etanol a 10%)[40]; Weller e Dammin (ácido clorídrico-triton NE-éter)[73]; Loughlin e Stoll (ácido clorídrico-éter-xilol, AEX)[47]; Loughlin e Spitz (calgon-éter-xilol, CEX)[48]; Hunter e cols. (sulfato de sódio-ácido clorídrico-triton-éter, AMS III)[39]; Ritchie (formalina-éter, FE)[61]; Blagg e cols. (mertiolato-iodo-formaldeído, MIFC)[9]; Oshima e cols. (Tween 80-solução tampão de citrato)[58] e Bailenger (acetato de sódio-ácido acético)[4]. Alguns autores recomendam o uso conjunto das técnicas de flutuação e sedimentação na rotina laboratorial; entretanto, esta conduta é impraticável para a maioria dos laboratórios[11,71].

Sedimentação Espontânea

A técnica de Lutz[49] ou de Hoffman, Pons e Janer[37] é um procedimento simples, indicado para a pesquisa de ovos, larvas e cistos. Fundamenta-se na sedimentação espontânea em água (combinação da gravidade e da sedimentação). Os ovos operculados e de esquistossoma são facilmente recuperados. O uso de grande quantidade de material fecal nesse processo, em contraste com as pequenas quantidades usadas em outras técnicas, favorece um diagnóstico satisfatório e seguro, mesmo quando o número de organismos presentes é pequeno. A grande vantagem da técnica de sedimentação em água para a concentração de cistos de protozoários e ovos e larvas de helmintos, no material fecal, é a necessidade mínima de vidraria, sendo dispensável o uso de reagentes e da centrifugação. A desvantagem desse processo de diagnóstico coprológico é a grande quantidade de detritos fecais no sedimento, dificultando, com freqüência, a preparação e o exame da lâmina. Faust, Ingalls e See[28] recomendam substituir a água corrente por uma solução aquosa de glicerina a 0,5% (v/v), para diminuir a tensão superficial e aumentar o número de organismos.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas).

Técnica

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colocar cerca de 5g de fezes frescas, colhidas de várias partes do bolo fecal, em copo graduado ou em *beaker* de 250ml. Completar o volume de 50 a 60ml com água corrente e misturar vigorosamente.

3. Preparar a suspensão juntando 100ml de água corrente.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

4. Filtrar a suspensão através de gaze, levemente umedecida em água corrente, dobrada duas vezes e receber o filtrado em copo cônico com capacidade de 125ml. A suspensão pode ser filtrada através de filtro descartável (Parasitofiltro®), com alça de segurança, levemente umedecido em água corrente (Fig. 2.10A).

5. Se necessário, adicionar água corrente até completar aproximadamente 3/4 do volume do copo cônico. Deixar a suspensão em repouso durante uma a duas horas (Fig. 2.10B).

6. Com uma longa pipeta capilar, fixada a um bulbo de borracha, colher uma pequena porção do sedimento na camada inferior, depositando-o sobre uma lâmina. Se a preparação estiver muito espessa, diluir com uma gota de solução salina a 0,85% ou água corrente. Colher amostras adicionais do centro e do fundo do sedimento (Fig. 2.10C).

7. Examinar ao microscópio a presença de ovos, larvas e cistos.

Observações

1. Melvin e Brooke[56], Ash e Orihel[3] apresentam a seguinte conduta depois de concluída a etapa 4: a) decantar com cuidado 2/3 do líquido sobrenadante sem perder nenhuma porção do sedimento; b) ressuspender o sedimento em água corrente e deixar a suspensão em repouso por mais uma hora.

2. Esse procedimento de lavagem pode ser repetido até que o líquido sobrenadante fique relativamente claro. Após, seguir as etapas 5 e 6 na técnica anteriormente descrita.

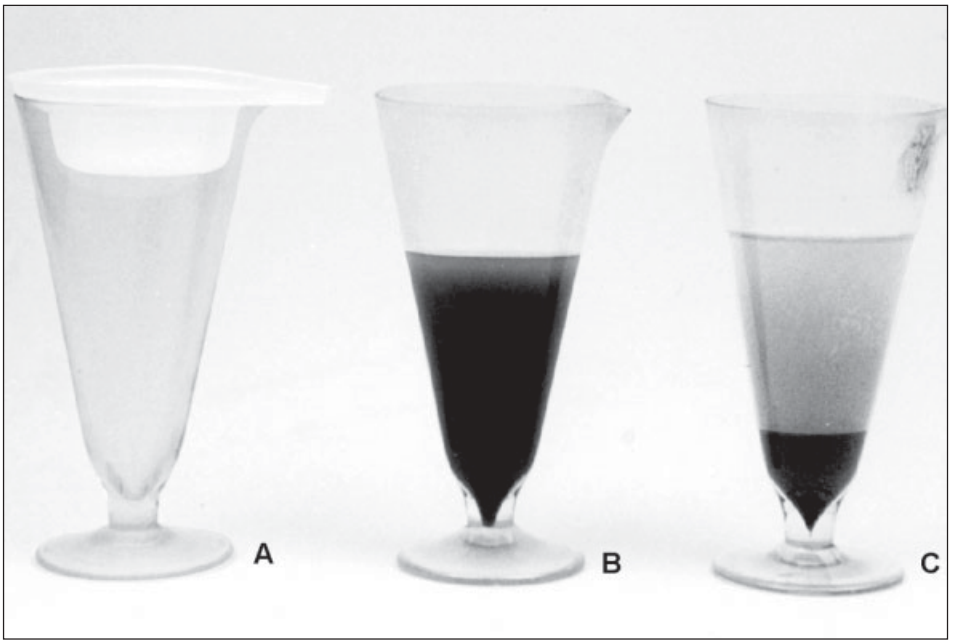


Fig. 2.10 — *Sedimentação espontânea. A) copo cônico de sedimentação com filtro descartável (Parasitofiltro®) com alça de segurança; B) fezes em suspensão; C) sedimentação após duas horas.*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Amostra

Material fecal preservado pela solução de formaldeído a 10%.

Reagentes

1. Solução salina a 0,85% (ver p. 35)
2. Solução de formaldeído a 10% (ver p. 9)

Técnica

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.
2. Misturar o material fecal fixado pela solução de formaldeído.
3. Filtrar a suspensão através de gaze, levemente umedecida em água corrente, dobrada duas vezes e receber o filtrado em copo cônico de sedimentação com capacidade de 125ml. A suspensão pode ser filtrada através do filtro descartável (Parasitofiltro®) com alça de segurança levemente umedecido em água corrente.
4. Se necessário, adicionar água corrente, até completar aproximadamente 3/4 do volume do copo cônico. Deixar a suspensão em repouso durante uma a duas horas.
5. Decantar com cuidado 2/3 do líquido sobrenadante, sem perder nenhuma porção do sedimento.
6. Ressuspender o sedimento em água corrente e deixar a suspensão em repouso por mais uma hora.
7. Esse procedimento de lavagem pode ser repetido até que o líquido sobrenadante fique relativamente claro. Após, seguir as etapas 5 e 6 da técnica descrita por Hoffman, Pons e Janer[37].

Amostra

Material fecal preservado pela solução de mertiolato-iodo-formaldeído (MIF).

O material fecal preservado pela solução de MIF pode ser concentrado pela sedimentação espontânea.

Reagentes

1. Solução I (Solução estoque MF) (ver p. 19)
2. Solução II (Solução de Iodo de Lugol) (ver p. 38)

Técnica

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Misturar o material fecal fixado pelo MIF.

3. Filtrar a suspensão através de gaze, levemente umedecida em água corrente, dobrada duas vezes e receber o filtrado em um copo cônico de sedimentação com capacidade de 125ml. A suspensão pode ser filtrada através de filtro descartável (Parasitofiltro®), com alça de segurança, levemente umedecido em água corrente.

4. Adicionar água corrente, se necessário, até completar repouso durante uma a duas horas.

5. Decantar com cuidado 2/3 do líquido sobrenadante sem perder nenhuma porção do sedimento.

6. Ressuspender o sedimento com água corrente, e deixar a suspensão em repouso por mais uma hora.

7. Esse procedimento de lavagem pode ser repetido até que o líquido sobrenadante fique relativamente claro.

8. Com uma longa pipeta capilar, fixada a um bulbo de borracha, colher uma pequena porção do sedimento na camada inferior, depositando-o sobre uma lâmina. Se a preparação estiver muito espessa, diluir com uma gota de solução salina a 0,85% ou com água corrente. Colher amostras adicionais do centro e do fundo do sedimento.

9. Examinar ao microscópio para a presença de ovos, larvas e cistos.

Observações

1. O filtrado pode ser recebido em tubo de centrífuga de 15ml com fundo redondo e pode ser centrifugado (500-650 x *g*/1min).

2. Preparar as lâminas para a pesquisa de parasitos com o sedimento.

Centrífugo-Sedimentação pela Formalina-Éter ou Centrífugo-Sedimentação pela Formalina-Acetato de Etila

Existem inúmeras variações nas técnicas de sedimentação pelo emprego da centrifugação, todas elas são derivadas do procedimento original de Telemann[69]. Ritchie[61] apresentou, em 1948, uma técnica eficiente para recuperar e identificar cistos de protozoários e ovos e larvas de helmintos, incluindo ovos operculados e de esquistossoma em material fecal fresco, preservado pelo formaldeído. Maldonado e Acosta-Matienzo[50], Maldonado, Acosta-Matienzo e Veliz-Herrera[51] modificaram o método original de Ritchie[61] acrescentando à formalina o Triton NE, um detergente não-iônico, com o objetivo de aumentar a eficiência da técnica[56]. Alguns autores recomendam substituir o éter etílico pelo acetato de etila[3,16,56,75,76,77]. Este reativo é inflamável, mas pode ser usado com espécimes conservados com formaldeído e fixador APV.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Reagentes

1. Solução de formaldeído a 10% (v/v) (ver p. 9)
2. Acetato de etila ($C_4H_8O_2$)
3. Éter etílico ($C_4H_{10}O$)
4. Solução salina a 0,85% (ver p. 35)

Técnica

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colocar 1 ou 2g de fezes frescas colhidas de várias partes do bolo fecal em frasco contendo 10ml de água corrente ou solução salina a 0,85%.

3. Filtrar a suspensão através de gaze, levemente umedecida em água corrente, dobrada duas vezes e receber o filtrado em um tubo de centrífuga de 15ml com fundo redondo. A suspensão pode ser filtrada através de filtro descartável (Parasitofiltro®), com alça de segurança, levemente umedecido em água corrente.

4. Centrifugar (650 x *g*/1min).

5. Decantar o sobrenadante e adicionar 1 a 2ml de água corrente ou solução salina a 0,85% ao sedimento antes de ressuspendê-lo. Completar com água corrente (ou solução salina a 0,85%) 2/3 do volume do tubo. Agitar e centrifugar (650 x *g*/1min).

6. Repetir a etapa 4, até que o sobrenadante se apresente relativamente claro.

7. Depois que o último sobrenadante é decantado, ressuspender o sedimento com 1 a 2ml de formalina a 10% (dar preferência à solução tamponada de formalina a 10%, pH neutro). Completar o volume da suspensão em 10ml com formalina a 10%. Deixar em repouso durante cinco minutos.

8. Adicionar 3ml de éter ou acetato de etila, fechar o tubo e agitar vigorosamente, na posição invertida, por 30 segundos. Remover a tampa com cuidado.

9. Centrifugar (500 x *g*/1min). Quatro camadas se formarão: 1.ª) sedimento no fundo do tubo contendo os parasitos; 2.ª) camada de formalina; 3.ª) tampão de detritos fecais; e 4.ª) camada de éter na superfície (Fig. 2.11A).

10. Afrouxar e separar o tampão de detritos das paredes do tubo com um estilete fino e, com cuidado, decantar as três camadas superiores. Limpar com *swab* de algodão as paredes do tubo, removendo os detritos remanescentes (Fig. 2.11B).

11. Uma pequena quantidade do líquido que permanece nas paredes do tubo escorre para o fundo junto ao sedimento. Misturar o líquido e o sedimento, preparando as lâminas para a pesquisa de ovos, larvas e cistos (Fig. 2.11C, D).

Observações

1. Ritchie e cols.[62] relataram que o pH da formalina afeta o encontro dos ovos e cistos no sedimento. Ovos de *A. lumbricoides* e *Schistosoma*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

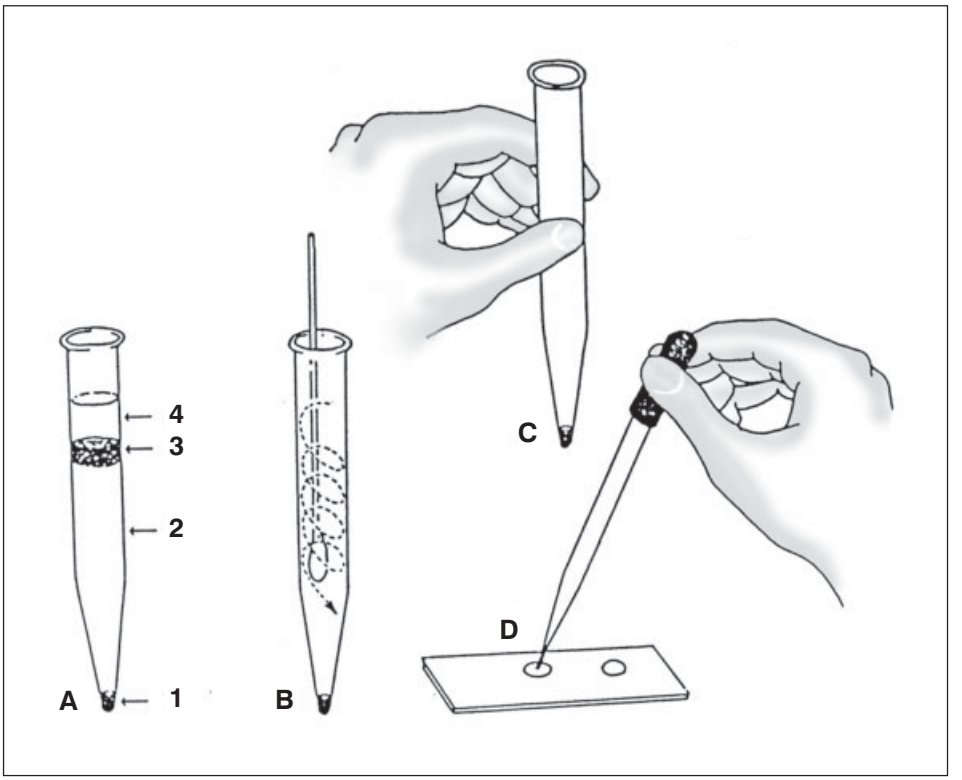


Fig. 2.11 — *Centrífugo-sedimentação pela formalina-éter. A) Quatro camadas no tubo de centrífuga; B) Limpeza das paredes do tubo com* swab *de algodão; C) Sedimento; D) Preparação da lâmina. (Adaptada de Ash LR, Oriehl TC. Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. Chicago (Ill): ASCP Press, 1991).*

japonicum são melhores recuperados em pH 10,0, enquanto os ancilostomídeos são muito bem identificados nos valores de pH 4,0 e 7,0. Os ovos de *T. trichiura* e cistos de protozoários aparentemente não são afetados pelas mudanças do pH, mas os melhores resultados são obtidos no pH 7,0. Esses dados mostram que a formalina no pH neutro é mais eficaz do que a formalina não tamponada no estudo dos parasitos[27,56].

2. Não usar gaze com mais de duas camadas de espessura; gaze mais espessa pode reter o muco (contendo oocistos de *Cryptosporidium* e de *Cyclospora* e/ou esporos de microsporídios).

3. Tubo com fundo redondo é mais apropriado do que tubo cônico de centrífuga de 15ml. A água corrente poderá ser substituída pela solução salina a 0,85% durante todo o procedimento, conquanto a adição de água às fezes frescas causa a ruptura dos cistos de *Blastocystis hominis* (corpo central). Alguns autores preferem o uso de formalina a 5 e 10% em substituição à água corrente em todas as etapas da lavagem.

4. Com os espécimes preservados com SAF, a técnica deve iniciar na etapa 2. O acetato de etila é mais eficiente do que éter etílico na pesquisa de ovos de *Taenia* spp. ou *H. nana* ou cistos de *G. lamblia*, havendo menor tendência para que esses ovos e cistos fiquem retidos no tampão de detritos fecais. O acetato de etila não produz tão bons resultados como o éter etílico na extração de gorduras ou do material mucóide dos espécimes fecais.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

5. Os resultados obtidos pelo exame direto (exame direto a fresco ou concentração dos espécimes fecais) usualmente devem ser confirmados pela coloração permanente de esfregaços, pois alguns protozoários são muito pequenos e de difícil identificação.

6. Colorações especiais também são necessárias para a identificação dos organismos. A confirmação é particularmente importante nos casos de *E. histolytica* em oposição a *E. coli*. Certos parasitos (*G. lamblia*, ancilostomídeos e, ocasionalmente, *T. trichiura*) preservados pelo fixador APV não são satisfatoriamente concentrados como o material fecal preservado pelo formaldeído.

7. A morfologia das larvas de *Strongyloides stercoralis* apresenta problemas de identificação morfológica, o que não ocorre com os espécimes preservados pelo formaldeído. Os oocistos de *Isospora belli*, por razões ainda desconhecidas, são rotineiramente perdidos e não identificados no sedimento concentrado de espécimes preservados em fixador APV, o que não ocorre quando as fezes são fixadas pela formalina.

Amostra

Material fecal preservado pela solução de formaldeído a 10%.

Reagentes

1. Solução de formaldeído a 10% (v/v) (ver p. 9)
2. Acetato de etila ($C_4H_8O_2$)
3. Éter etílico ($C_4H_{10}O$)
4. Solução salina a 0,85% (ver p. 35)

Técnica

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Misturar o material fecal fixado pela solução de formaldeído.

3. Filtrar a suspensão através de gaze, levemente umedecida em água corrente, dobrada duas vezes e receber o filtrado em um tubo com fundo redondo de centrífuga de 15ml. A suspensão pode ser filtrada através de filtro descartável (Parasitofiltro®), com alça de segurança, levemente umedecido em água corrente.

4. Completar o volume em 10ml com água corrente (ou solução salina a 0,85%). Centrifugar (500 x *g*/2min).

5. Decantar o sobrenadante e, se necessário, realizar uma segunda lavagem em água corrente (ou solução salina a 0,85%).

6. Adicionar 3ml de éter etílico (ou acetato de etila). Fechar o tubo e agitar vigorosamente, na posição invertida, por 30 segundos. Remover a tampa com cuidado.

7. Centrifugar (500 x *g*/2min). Quatro camadas se formarão (Fig. 2.11).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

8. Afrouxar e separar o tampão de detritos das paredes do tubo com estilete fino e com cuidado, decantar as três camadas superiores. Limpar com *swab* de algodão as paredes do tubo, removendo os detritos remanescentes.

9. Uma pequena quantidade do líquido que permanece nas paredes do tubo escorre para o fundo junto ao sedimento. Misturar o líquido e o sedimento e preparar as lâminas para a pesquisa de ovos, larvas e cistos.

Amostra

Material fecal preservado pelo fixador álcool polivinílico (fixador APV).

Reagentes

1. Acetato de etila ($C_4H_8O_2$)
2. Éter etílico ($C_4H_{10}O$)
3. Solução de formaldeído a 10% (ver p. 9)
4. Solução salina a 0,85% (ver p. 35)
5. Fixador álcool polivinílico (fixador APV) (ver p. 14)

Técnica

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Misturar o material fecal preservado pelo fixador APV.

3. Transferir aproximadamente a metade do volume a um copo graduado ou *beaker* e adicionar o mesmo volume de solução salina a 0,85%.

4. Filtrar a suspensão através de gaze, levemente umedecida em água corrente, dobrada duas vezes, e receber o filtrado em um tubo de centrífuga de 15ml com fundo redondo. A suspensão pode ser filtrada através de filtro descartável (Parasitofiltro®), com alça de segurança, levemente umedecido em água corrente.

5. Centrifugar (500 x *g*/2min).

6. Decantar o sobrenadante e adicionar 1 a 2ml de solução salina a 0,85% ao sedimento antes de ressuspendê-lo. Completar 2/3 do volume do tubo com salina a 0,85%, agitar e centrifugar (500 x *g*/2min).

7. Eliminar ou repetir a etapa 5, até que o sobrenadante se apresente relativamente claro. O procedimento continua, como foi descrito na técnica original de Ritchie[61], relatada anteriormente, iniciando na etapa 6.

Observações

1. Garcia e Bruckner[30] recomendam, na etapa 7, não usar éter se o sedimento do fundo do tubo for muito pequeno; completar a metade do volume do tubo com solução de formaldeído a 10%; centrifugar e decantar, examinando após o sedimento remanescente.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Carroll, Cook e Turner[14], comparando a técnica da centrífugo-sedimentação em formaldeído-éter ou formaldeído-acetato de etila com o material preservado em solução de formaldeído a 10% e em fixador APV, demonstraram que a concentração é mais eficaz quando os espécimes são preservados em solução de formaldeído a 10%.

Amostra

Material fecal preservado pela solução de mertiolato-iodo-formaldeído (MIF). O material fecal preservado pela solução MIF pode ser concentrado pela centrífugo-sedimentação (MIFC). A MIFC é uma técnica semelhante à centrífugo-sedimentação com formalina-éter[61], exceto a solução MIF que substitui a formalina[9]. Esse procedimento é indicado para a pesquisa de cistos de protozoários e ovos e larvas de helmintos.

Reagentes

1. Solução I (Solução estoque MF) (ver p. 19)
2. Éter etílico ($C_4H_{10}O$)

Técnica

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Misturar o material fecal fixado com o MIF (ver observações sobre a instabilidade da solução fixadora MIF).

3. Filtrar a suspensão através de gaze, levemente umedecida em água corrente, dobrada duas vezes e receber o filtrado em um tubo de centrífuga de 15ml com fundo redondo. A suspensão pode ser filtrada através de filtro descartável (Parasitofiltro®), com alça de segurança, levemente umedecido em água corrente.

4. Completar o volume em 10ml com solução preservadora MIF.

5. Adicionar 3ml de éter. Fechar o tubo e agitar vigorosamente, na posição invertida, no mínimo por um minuto. Remover a tampa com cuidado.

6. Centrifugar (500 x *g*/1min). Quatro camadas se formarão: 1.ª) sedimento no fundo do tubo contendo os parasitos; 2.ª) camada de solução MIF; 3.ª) tampão de detritos fecais; e 4.ª) camada de éter na superfície.

7. Afrouxar e separar o tampão de detritos das paredes do tubo com estilete fino e com cuidado decantar as três camadas superiores. Limpar as paredes do tubo com *swab* de algodão, removendo os detritos remanescentes.

8. Com uma pipeta capilar, colher o sedimento e preparar uma lâmina para pesquisa de ovos, larvas e cistos.

Observações

Esta técnica, de acordo com os autores[9], revela trofozoítos e cistos de protozoários e ovos e larvas de helmintos.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Amostra

Material fecal preservado pela solução fixadora acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF).

A solução fixadora SAF, originalmente descrita por Junot[41], é usada como preservadora de material fecal e, subseqüentemente, aplicada em técnica de concentração[76]. Esse procedimento é realizado como a técnica original de Ritchie[61] (centrífugo-sedimentação pela formalina) descrita anteriormente, iniciando-se na etapa 2.

Amostra

Material fecal preservado pela solução fixadora fenol-álcool-formaldeído (PAF).

O fixador PAF foi descrito por Burrows[12]. As modificações introduzidas na técnica de concentração, com a adição de diferentes reagentes, como solução salina a 0,85%, Triton NE e éter, resultaram em um procedimento muito bom para a identificação de parasitos. Esse procedimento é realizado como a técnica original de Ritchie (centrífugo-sedimentação pela formalina-éter)[61] descrita anteriormente, iniciando-se na etapa 2.

Centrífugo-Sedimentação pelo Sulfato de Sódio-Ácido Clorídrico-Triton-Éter (AMS III)

Hunter e cols.[39] desenvolveram uma técnica de centrífugo-sedimentação que combina o sulfato de sódio, o ácido clorídrico, Triton e éter etílico (AMS III), para a identificação de ovos de esquistossomo[44]. Esse procedimento é indicado para o diagnóstico de muitas outras espécies de helmintos.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas).

Reagentes

1. Éter etílico ($C_4H_{10}O$)
2. Triton 80 (ou Triton NE)
3. Ácido clorídrico a 37% (HCl)
4. Sulfato de sódio (Na_2SO_4)

Preparação das Soluções

1. Solução A

Ácido clorídrico a 37%	45ml
Água destilada-deionizada	55ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Solução B

Sulfato de sódio	9,6g
Água destilada-deionizada	100ml

3. Solução AMS

• Misturar, antes do uso, as soluções A e B na proporção de 1:1. Ajustar a densidade em 1,08g/ml, com densitômetro, pela adição da solução de sulfato de sódio ou água.

Técnica

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colocar 1 ou 2g de fezes colhidas de várias partes do bolo fecal em frasco contendo 10ml de água corrente.

3. Completar o volume de 15ml com água corrente e filtrar a suspensão através de gaze, levemente umedecida com água corrente, dobrada duas vezes, e receber o filtrado em um tubo de centrífuga de 20 a 25ml com fundo redondo. A suspensão pode ser filtrada através do filtro descartável (Parasitofiltro®), com alça de segurança, levemente umedecido em água corrente.

4. Agitar e centrifugar (500 x *g*/1min).

5. Decantar o sobrenadante e adicionar ao sedimento 5ml da solução AMS, três gotas de Triton 80 (ou Triton NE) e 5ml de éter. Fechar o tubo e agitar vigorosamente, na posição invertida, por 30 segundos. Remover a tampa com cuidado.

6. Centrifugar (500 x *g*/2min).

7. Decantar o tampão de detritos e o líquido sobrenadante. Limpar com *swab* de algodão as paredes do tubo, removendo os detritos remanescentes.

8. Colher o sedimento com uma longa pipeta capilar e preparar as lâminas para a pesquisa de parasitos[11,67].

Observações

1. Essa técnica apresenta um sedimento bastante claro, quando comparado com as outras técnicas, sendo os ovos facilmente reconhecidos. Faust e cols.[28] eliminaram o ácido clorídrico para evitar a destruição de alguns ovos.

2. Maldonado e Acosta-Matienzo[50] relataram que este procedimento, sem o ácido clorídrico, é um excelente processo para a identificação de ovos de *Schistosoma mansoni*. Os protozoários não são recuperados por esta técnica[67].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Centrífugo-Sedimentação pelo Acetato de Sódio-Ácido Acético

A técnica de Bailenger[4,31,46] é usada na rotina do Laboratoire de Parasitologie, Hôpital Charles Nicolle, 1, rue de Germont, 76031 Rouen, France.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas).

Reagentes

1. Acetato de sódio anidro ou hidratado ($C_2H_3O_2Na.3H_2O$)
2. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
3. Éter etílico ($C_4H_{10}O$)

Preparação da Solução

Solução de Bailenger

Acetato de sódio	15g
Ácido acético	3,6ml
Água destilada-deionizada	1.000ml

• O líquido de diluição é o tampão aceto-acético no pH 5,0. Ajustar o pH, se necessário, com ácido acético.

Técnica

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colocar em frasco, contendo pequenas esferas de vidro, 20ml da solução de Bailenger e 2 ou 3g de fezes, coletadas de várias partes do bolo fecal.

3. Agitar durante um minuto e filtrar a suspensão através de gaze levemente umedecida em água corrente, dobrada duas vezes. A suspensão pode ser filtrada através do filtro descartável (Parasitofiltro®), com alça de segurança, levemente umedecido em água corrente.

4. Transferir 4ml do filtrado para tubo de centrífuga de 15ml com fundo redondo e adicionar 2ml de éter. Fechar o tubo e agitar vigorosamente, na posição invertida, no mínimo por um minuto. Remover a tampa com cuidado.

5. Centrifugar (500 x *g*/1min). Quatro camadas se formarão: 1.ª) sedimento no fundo do tubo contendo os parasitos; 2.ª) camada de acetato de sódio; 3.ª) tampão de detritos; e 4.ª) camada de éter na superfície.

6. Afrouxar e separar o tampão de detritos das paredes do tubo com estilete ou com *swab* de algodão, removendo os detritos remanescentes.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

7. Com pipeta capilar, colher o sedimento e preparar lâmina para a pesquisa de parasitos.

Observações

Bailenger[3] substituiu nesta técnica a solução de formaldeído a 10% pelo líquido de diluição acetato-acético em pH 5,0, no qual, conforme o autor, os parasitos são mais facilmente concentrados.

Controle de Qualidade (CQ): Técnicas de Sedimentação

1. Verificar os reagentes sempre que forem usados. A formalina e a solução salina devem apresentar aparência clara sem nenhuma contaminação visível.

2. Trimestralmente ou sempre que a centrífuga for calibrada, amostras fecais sabidamente positivas devem ser concentradas e os organismos identificados.

3. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

4. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[16,30].

Corante Iodo-Tricrômico para Sedimento

A combinação da solução de iodo de Lugol e do corante tricrômico é usada para corar o sedimento fecal proveniente das técnicas de concentração[36]. Os ovos e os cistos são corados de marrom-amarelo (iodo) e os detritos fecais coram-se em verde (tricrômico), produzindo um contraste que facilita a identificação dos parasitos. Esse exame direto é indicado como um procedimento suplementar, mas não deve substituir o exame direto não corado do sedimento fecal concentrado.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas) ou preservado pela solução de formaldeído a 10%.

Reagentes

1. Solução de iodo de Lugol (ver p. 19)
2. Corante tricrômico (ver p. 105)

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Coloração do Sedimento

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.

2. Misturar em um tubo de ensaio quatro gotas da solução de iodo de Lugol e igual volume do sedimento fecal concentrado. Agitar a mistura.

3. Transferir duas gotas da mistura, solução de iodo de Lugol-sedimento fecal concentrado, para uma lâmina de microscopia.

4. Adicionar uma gota do corante tricrômico à mistura solução de iodo de Lugol-sedimento fecal concentrado.

5. Cobrir a preparação com uma lamínula (22 x 22mm) e examinar através de pequeno aumento (100X) e de grande aumento (400X). A suspensão não deve ser muito espessa, nem muito diluída; considera-se boa a suspensão que permite ler por transparência os caracteres comuns de um jornal.

Características da Coloração

Os trofozoítos e/ou cistos de protozoários e alguns ovos e larvas de helmintos são observados e identificados. Os cistos de protozoários apresentam problemas na identificação a nível de espécie (depende dos detalhes e da clareza da morfologia). Os ovos de *A. lumbricoides* e *Taenia* spp. tomam uma coloração marrom-escura, dificultando sua identificação, podendo ser confundidos com detritos. Essa coloração apresenta um matiz mais escuro do que a coloração tradicional pela solução de iodo de Lugol, conseqüentemente deve haver um aumento da intensidade de iluminação do microscópio.

Controle de Qualidade (CQ): Corante Iodo-Tricrômico para Sedimento

1. Deve ser verificado diariamente se a solução de iodo está transparente e não contaminada com bactérias ou fungos.

2. A solução de iodo deve apresentar cor marrom forte (chá da Índia ou vinho do Porto), apresentando uma correta intensidade de contraste. Desprezar as soluções fracas.

3. Nos cistos dos protozoários, corretamente corados pela solução de iodo, o glicogênio, se presente, exibe uma coloração castanho-avermelhada, o citoplasma cora-se em amarelo e a cromatina periférica dos núcleos, em preto ou marrom. As características dos núcleos são bem distintas, enquanto os corpos cromatóides são pouco visíveis.

4. Leucócitos humanos misturados com fezes negativas podem ser usados como CQ da amostra fecal. Os leucócitos coram-se com a mesma coloração como são vistos os protozoários. O citoplasma dos leucócitos apresenta coloração amarelo-ouro.

5. Uma amostra sabidamente positiva também pode ser utilizada para CQ. A amostra para CQ deve ser examinada ao menos trimestralmente ou sempre que for preparado um novo corante.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

6. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

7. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[30].

Observações

1. O corante iodo-tricrômico é mais escuro do que as soluções de iodo usualmente usadas na rotina laboratorial (Lugol, Dobell e O'Connor e D'Antoni), conseqüentemente não é indicado no exame direto de esfregaços. Esse procedimento é particularmente importante porque os ovos de *A. lumbricoides* e *Taenia* spp. adquirem uma supracoloração, podendo não ser reconhecidos como ovos de helmintos. Alguns protozoários, muito pequenos e de difícil identificação, podem ser facilmente omitidos.

2. Os resultados obtidos com o exame direto devem ser confirmados pelas preparações de esfregaços permanentes corados. A confirmação é importante nos casos da *E. histolytica* em oposição a *E. coli*; essa identificação deve ser reportada como preliminar. O resultado final será apresentado após a preparação de esfregaços permanentes corados.

3. Nas infecções maciças pelo *Cryptosporidium parvum* são observados oocistos; entretanto, as modificações da coloração de Ziehl-Neelsen e/ou a pesquisa de anticorpos monoclonais são os procedimentos indicados para o diagnóstico desse organismo. Os oocistos de *I. belli* são também identificados, enquanto os oocistos de *Cyclospora cayetanensis* não são visualizados, sendo confundidos com detritos fecais.

4. Os esporos dos microsporídios não são visíveis através do exame direto. São muito pequenos, com forma semelhante aos artefatos e detritos das fezes.

TÉCNICAS DE CONCENTRAÇÃO ESPECÍFICAS PARA COCCÍDIOS

Inúmeras técnicas de concentração são usadas com o objetivo de aumentar a sensibilidade do exame, como também diminuir os artefatos fecais. Os organismos poderão ter sua morfologia alterada pela desidratação através de líquidos hipertônicos usados nesses procedimentos, devendo o exame microscópico ser rápido. A membrana colhida nas técnicas de flutuação é examinada sem fixação e coloração, em microscópio de contraste de fase, ao passo que o sedimento colhido após a realização das técnicas de sedimentação é examinado sem coloração ou corado.

Centrífugo-Flutuação em Solução de Sacarose

A técnica de Sheather[66], adaptada por Current[18,19], é recomendada para a pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em material fecal fresco ou preservado em solução de formaldeído.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas) ou preservado pela solução de formaldeído a 10%.

Reagentes

1. Sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)
2. Fenol, cristais (C_6H_6O)
3. Solução de formaldeído a 10% (v/v) (ver p. 9)

Preparação da Solução

Solução de Sacarose de Sheather, densidade 1,2g/ml

Sacarose	500g
Fenol (fundido a 44°C)	6,5g
Água destilada-deionizada	320ml

• Ferver a solução de sacarose até clarificar e adicionar, com cuidado, o fenol. Deixar esfriar à temperatura ambiente antes de usar.

Técnica

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colocar 1 ou 2g de fezes formolizadas ou formadas colhidas de várias partes do bolo fecal em frasco contendo 10ml de água corrente.

3. Filtrar a suspensão através de gaze levemente umedecida em água corrente, dobrada duas vezes, e receber o filtrado em um tubo de centrífuga de 15ml com fundo redondo. A suspensão pode ser filtrada através do filtro descartável (Parasitofiltro®), com alça de segurança, levemente umedecido em água corrente.

4. Adicionar a solução de sacarose de Sheather até 3/4 do tubo (aproximadamente 10ml).

5. Agitar vigorosamente 1 a 2ml da suspensão fecal com 10ml da solução de sacarose. Completar o volume do tubo com a solução de sacarose.

6. Colocar uma lamínula (22 x 22mm) na borda do tubo, mantendo-a em contato com a solução de sacarose.

7. Centrifugar (500 x *g*/10min). Remover a lamínula, invertendo sua posição, colocando a face com a gota sobre a lâmina.

8. Examinar em microscópio de contraste de fase.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Controle de Qualidade (CQ): Centrífugo-Flutuação em Solução de Sacarose

1. Verificar os reagentes sempre que forem usados. A solução de sacarose de Sheather deve ter aparência clara sem nenhuma contaminação visível.

2. Trimestralmente ou sempre que a centrífuga for calibrada, amostras fecais sabidamente positivas devem ser concentradas e os organismos identificados.

3. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

4. A densidade da solução de sacarose é crítica, devendo ser ajustada com densitômetro pela adição de sal ou água.

5. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[17].

Observações

1. A combinação da flutuação em solução de açúcar de Sheather com a microscopia de contraste de fase é um excelente procedimento para identificar e distinguir os oocistos das células de levedura contaminantes.

2. O *C. parvum* aparece como um corpo esférico refringente, medindo de 4 a 5μm, contendo quatro grânulos escuros. A técnica de Sheather[66], adaptada por Current[15,16], não é recomendada para os exames de rotina com fezes frescas de pacientes com SIDA/AIDS, porque o líquido poderá escorrer para fora do tubo e contaminar a centrífuga. Neste caso, os tubos de centrífuga deverão ter tampas para evitar também a formação de aerossóis. Recomenda-se trabalhar em capela de fluxo laminar vertical.

3. Para impedir a exposição desnecessária do material fecal, que pode conter o vírus HIV e/ou outros patógenos, é indicada uma modificação dessa técnica de flutuação.

4. Manter a solução de flutuação 1 a 3cm abaixo da borda do tubo, transferir a película formada na superfície da solução de Sheather para uma lâmina de microscopia, com o auxílio de alça de platina e, após, colocar a lamínula. Observar com microscópio de contraste de fase ou de campo claro. Alguns autores recomendam fixar a película e corar pelos métodos de Giemsa, Henriksen e Pohlenz ou Kinyoun (a quente)[35].

Centrífugo-Sedimentação pelo Formaldeído-Éter Modificado

A técnica de Ritchie[61], modificada por Allen e Ridley[1], é a que apresenta os melhores resultados para a pesquisa de oocistos. A concentração pode ser realizada a partir de fezes frescas ou formolizadas. Sendo a amostra mucosa, ela deverá ser fluidificada, sob agitação, com algumas gotas de hidróxido de potássio a 10%.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas) ou preservado pela solução de formaldeído a 10%.

Reagentes

1. Solução de formaldeído a 10% (v/v) (ver p. 9)
2. Éter etílico ($C_4H_{10}O$)

Técnica

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Diluir 1 ou 2g de fezes frescas ou formolizadas em 7ml de solução de formaldeído a 10%.

3. Filtrar a suspensão através de gaze levemente umedecida em água corrente, dobrada duas vezes, e receber o filtrado em um tubo de centrífuga de 15ml com fundo redondo. A suspensão pode ser filtrada através do filtro descartável (Parasitofiltro®), com alça de segurança, levemente umedecido em água corrente.

4. Adicionar 3ml de éter, fechar o tubo e agitar vigorosamente, na posição invertida, por 30 segundos. Remover a tampa com todo cuidado.

5. Centrifugar (500 x *g*/2min). Quatro camadas se formarão: 1.ª) sedimento no fundo do tubo contendo os parasitos; 2.ª) camada de formalina; 3.ª) tampão de detritos fecais; e 4.ª) camada de éter na superfície (Fig. 2.11A).

6. Afrouxar e separar o tampão de detritos das paredes do tubo com estilete fino e com cuidado decantar as três camadas superiores. Limpar com *swab* de algodão as paredes do tubo, removendo os detritos remanescentes (Fig. 2.11B).

7. Uma pequena quantidade de líquido permanece nas paredes do tubo, escorrendo para o fundo junto ao sedimento. Misturar o líquido e o sedimento e preparar as lâminas para a pesquisa de ovos, larvas e cistos (Fig. 2.11C e D). Corar o sedimento pelos métodos de Giemsa ou por uma das colorações derivadas de Ziehl-Neelsen.

Controle de Qualidade (CQ): Centrífugo-Sedimentação pelo Formaldeído-Éter Modificado.

1. Verificar os reagentes sempre que forem usados. A formalina e a solução salina devem apresentar aparência clara, sem nenhuma contaminação visível.

2. Trimestralmente ou sempre que a centrífuga for calibrada, amostras fecais sabidamente positivas devem ser concentradas e os organismos identificados.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

3. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

4. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[15,30].

Observações

1. Adicionar 10 gotas de solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 10% ao sedimento, quando este se apresentar mucóide[21,61].

2. Não usar gaze com mais de duas camadas de espessura; gaze mais espessa pode reter o muco (contendo oocistos de *Cryptosporidium* e de *Cyclospora* e/ou esporos de microsporídios). Tubo com fundo redondo é mais apropriado do que tubo cônico de centrífuga de 15ml.

3. A água corrente poderá ser substituída pela solução salina a 0,85% durante todo o procedimento, conquanto a adição de água às fezes frescas causa a ruptura dos cistos de *B. hominis* (corpo central).

4. Alguns autores preferem o uso de formalina em substituição à água corrente em todas as etapas da lavagem. Com os espécimes preservados com SAF, a técnica deve iniciar na etapa 2.

Centrífugo-Sedimentação pelo Hidróxido de Potássio

A técnica de Berlin[8] é indicada para a pesquisa de oocistos de *Cyclospora cayetanensis*. A concentração é realizada a partir de fezes frescas.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas).

Reagentes

1. Solução de hidróxido de potássio a 10% (KOH)
2. Solução salina a 0,85% (ver p. 35).

Técnica

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colocar cerca de 2g de fezes frescas, colhidas de várias partes do bolo fecal, em um tubo de centrífuga de 15ml de fundo redondo.

3. Adicionar 2ml de solução de hidróxido de potássio a 10%, fechar o tubo e agitar vigorosamente, na posição invertida, por 30 segundos.

4. Deixar a suspensão em repouso durante cinco minutos à temperatura ambiente. Adicionar 8 a 10ml de solução salina a 0,85%, fechar o tubo e agitar vigorosamente, na posição invertida, por 30 segundos.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

5. Filtrar a suspensão através de gaze levemente umedecida em água corrente, dobrada duas vezes e receber o filtrado em um tubo de centrífuga de 15ml com fundo redondo. A suspensão pode ser filtrada através do filtro descartável (Parasitofiltro®), com alça de segurança, levemente umedecido em água corrente. Centrifugar (2.000rpm/2min).

6. Decantar com cuidado o líquido sobrenadante sem perder nenhuma porção do sedimento. Ressuspender o sedimento com 10ml de solução salina a 0,85%, fechar o tubo e agitar vigorosamente, na posição invertida, por 30 segundos.

7. Centrifugar (2.000rpm/2min).

8. Decantar com cuidado o líquido sobrenadante sem perder nenhuma porção do sedimento.

9. Corar o sedimento por um dos métodos derivados de Ziehl-Neelsen[53].

REVISÃO: TÉCNICAS DE CONCENTRAÇÃO

Princípio: Concentração dos parasitos presentes por meio da flutuação e da sedimentação, com o objetivo de identificar e diagnosticar cistos de protozoários, oocistos de coccídios, esporos de microsporídios e ovos e larvas de helmintos.

Amostra: Espécimes fecais frescos ou preservados em formalina, fixador-APV, SAF e MIF.

Reagentes: Formalina a 5% e 10% (tamponada e não tamponada), éter, acetato de etila, sulfato de zinco (densidade 1,18g/ml para fezes frescas e 1,20g/ml para fezes preservadas); solução salina a 0,85% e soluções de iodo de Lugol e D'Antoni.

Exame: Examinar toda a lamínula (22 x 22mm) com pequeno aumento (100X) (recomenda-se a preparação de esfregaços corados pela solução de iodo); com grande aumento (400X), examinar no mínimo 1/3 da lamínula (preparações salinas e coradas pela solução de iodo).

Resultados: Os resultados da concentração, freqüentemente, são considerados presuntivos; entretanto, alguns organismos são definitivamente diagnosticados (cistos de *G. lamblia* e *Entamoeba* spp., ovos e larvas de helmintos e oocistos de *I. belli*). Esses resultados são caracterizados como preliminares, até que o diagnóstico final esteja disponível, após a concentração e o exame de preparações permanentes coradas.

Procedimentos e Limitações: Os procedimentos mais usados são as técnicas da sedimentação espontânea em água e a centrífugo-sedimentação pela formalina-éter ou centrífugo-sedimentação pela formalina acetato de etila. A centrífugo-flutuação em sulfato de zinco não detecta ovos operculados ou ovos pesados, a membrana e o sedimento devem ser examinados antes de reportar o resultado como negativo. Esfregaços preparados a partir de fezes concentradas são normalmente examinados com pequeno aumento (100X) e com grande aumento (400X). Realizar a morfometria com o micrômetro ocular.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allen AVH, Ridley DS. Further observations on the formol ether concentration technique parasites. J Clin Pathol, 23:545-448, 1970.
2. Amato Neto V, Corrêa LL. Exame Parasitológico da Fezes. São Paulo: Sarvier, 1980.
3. Ash LR, Oriehl TC. Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. Chicago (Ill): ASCP Press,1991.
4. Bailenger J. Coprologie Parasitaire et Fonctionelle. 3ª ed. Bordeaux: Drouillard, 1973.
5. Barlett MS, Harper K, Smith N et al. Comparative evaluation of modified zinc sulfate flotation technique. J Clin Microbiol, 7:524-528, 1978.
6. Bass CC. The diagnosis of hookworm infection with special reference to the examination of feces for eggs of intestinal parasites. Arch Diag, 3:231-236, 1910.
7. Beaver PC, Yokogawa M. Diagnostic techniques and training. In: Yokogawa M ed. Collect Papers on the Control of Soil-transmitted Helminthiases. Tokyo: APCO Research Group, 35-40, v.1, 1980.
8. Berlin OGW. Recovery of *Cyclospora* organisms from patientes with prolonged diarrhea. Clin Infect Dis, 18:606-609, 1994.
9. Blagg W, Schloegel EL, Mansour NS et al. A new concentration technique for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. Am J Trop Med Hyg, 4:23-28, 1955.
10. Bucki AJ, Wells WH, Vail JR. Technic for differentiating and preserving protozoa in feces. U.S. Armed Forces Med J, 4:1195-1199, 1953.
11. Burrows RB. Microscopic Diagnosis of the Parasites of Man. New Haven: Yale University Press, 1965.
12. Burrows RB. A new fixative and techniques for diagnosis of intestinal parasites. Am J Clin Pathol, 48:342-346, 1967.
13. Camp RR, Mattern CFT, Honigberg BH. Study of *Dientamoeba fragilis* Jepps & Dobell. I and II. J Protozool, 21:69-82, 1974.
14. Carroll MJ, Cook J, Turner JA. Comparison of polyvinyl alcohol and formalin-preserved fecal specimens in the formalin-ether sedimentation technique for parasitological examination. J Clin Microbiol, 18:1070-1072, 1983.
15. Crede P. Microscopic Examination of Fecal Specimens: Direct Smears 1992.7.3.5.1-7.3.5.4. v.2. In: Insenberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.3.3.1-7.3.3.3, v.2, 1992.
16. Crede P. Microscopic Examination of Fecal Specimens: Concentration by Formalin-Ethyl Acetate Sedimentation. In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.3.4.1-7.3.4.5, v.2, 1992.
17. Crede P. Microscopic Examination of Fecal Specimens: Concentration by Zinc Sulfate Flotation. In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.3.5.1-7.3.5.4, v.2, 1992.
18. Current WL. Human cryptosporidiosis. N Engl J Med, 309:614-615, 1983.
19. Current WL. Techniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium*. In: Dubey JP, Speer CA, Fayer R eds. Cryptosporidiosis of Man and Animals. Boca Raton (Fla): CRC Press, 31-58, 1990.
20. D'Antoni JS. Standardization of the iodine stain for wet preparations of intestinal protozoa. Am J Trop Med, 17:79-84, 1937.
21. Deluol AM, Cenac J, Matheron S et al. La cryptosporidiose. II Diagnostic biologique. Ann Biol Clin, 42:399-405, 1984.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

22. De Rivas D. An efficient and rapid method of concentration for the detection of ova and cysts of intestinal parasites. Am J Trop Med, 8:63-72, 1928.

23. Dobell C, O' Connor FW. The intestinal protozoa of man. London: John Bale, Sons & Danielsson, Ltda., 1921.

24. Donaldson R. An easy and rapid method for detecting protozoal cysts in faeces by means of wet-stained preparation. Lancet, 1:571-573, 1917.

25. Estevez EG, Levine JA. Examination of preserved stool specimens for parasites: lack of value of the direct wet mount. J Clin Microbiol, 22:666-667, 1985.

26. Faust EC, D'Antoni JS, Odon V, et al. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication. Am J trop Med, 18:169-183, 1938.

27. Faust EC, Sawitz W, Tobie J, et al. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. J Parasitol, 25:241-262, 1939.

28. Faust EC, Ingalls JW, See JK. The diagnosis of schistosomiasis japonica. II. Technics for the recovery of eggs. Am J Trop Med, 26:559-584, 1946.

29. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. New York: Elsevier Science Publishing, Inc., 1988.

30. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3rd ed. Washington (DC): ASM Press, 1997.

31. Golvan YJ, Drouhet E. Techniques en Parasitologie et en Mycologie. Paris: Flammarion Medecine-Sciences, 1972.

32. Gomori G. A rapid one-step trichrome stain. Am J Clin Pathol, 20:661-663, 1950.

33. Harper K. Routine Laboratory Procedure for Intestinal Parasitology. Procedure manual for intrastate use procedure by the parasitology section and microbiology section. Bureau of laboratory, Indiana State Board of Health, 1964.

34. Heidenhain M. Uber Vanadiumhaematoxylin. Pikroblauschwars ubd Kongo-korinth. Zischr f wiss Mikr, 25:401-410, 1908.

35. Henriksen S, Pohlenz J. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. Acta vet scand, 22:594-596, 1981.

36. Higgins GV. Iodine-trichrome staining technique: a eplacement of iodine solution on fecal examination. Lab Med, 19:824-825, 1988.

37. Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis *mansoni*. Puerto Rico J Publ Hlth, 9:281-298, 1934.

38. Honigberg BM. II. Taxonomic position and revision of the genus *Dientamoeba* Jepps & Dobell. In: Camp RR, Mattern CFT, Honigberg BM eds. Study of *Dientamoeba fragilis* Jepps & Dobell. I and II J Protozool, 21:69-82, 1974.

39. Hunter GW, Hodges E, Jahnes WG et al. Studies on schistosomiasis. II. Summary of further studies on methods of recovering eggs of *S. japonicum* from stools. Bull U.S Army Med Dept, 8:128-131, 1948.

40. Jahnes WG, Hodges E. An improved method of sedimenting *Schistosoma japonicum* and other helminth ova. J Parasitol, 33:483-486, 1947.

41. Junod C. Technique coprologique nouvelle essentiellement destinée a la concentration des trophozoites d'amibes. Bull Soc Pathol Exot Filiales, 65:390-398, 1972.

42. Kato K, Miura M. Comparative examinations. Jap J Parasitol, 3:35, 1954. (Texto em Japonês)

43. Kohn J. A rapid staining laboratory method for the diagnosis of intestinal protozoa in faeces. J Trop Med Hyg, 53:160-161, 1950.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

44. Komiya Y, Yokogawa M. The recovery of *Paragonimus* eggs from tools of paragonimiasis patients by AMS III centrifuging technic. Jpn Med Sci Biol, 6:207-211, 1953.

45. Komiya Y, Kobayashi A, Kumada M et al. Study on thick smear technique with cellophane cover for stool examination for helminth ova. Jap J Parasitol, 9:61, 1960. (Texto em Japonês)

46. Leger N, Notteghem MJ, Pesson B. Guide de Parasitologie Pratique. Paris: Société D'Édition D'Enseignement Supérieur, 1981.

47. Loughlin EH, Stoll NR. An efficient concentration method (AEX) for detecting helminthic ova in feces (modification of the Telemann technic). Am J Trop Med, 26:517-527, 1946.

48. Loughlin EH, Spitz, SH. Diagnosis of helminthiasis. J Am Med Assn, 139:997-1000, 1949.

49. Lutz AO. *Schistosomum mansoni* e a schistosomose, segundo observações feitas no Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz,11:121-155, 1919.

50. Maldonado JF, Acosta-Matienzo J. A comparison of fecal examination procedures in the diagnosis of schistosomiasis *mansoni*. Exp Parasit, 2:294-310, 1953.

51. Maldonado JF, Acosta-Matienzo J, Veliz-Herrera F. Comparative value fecal examination procedures in the diagnosis of helminth infection. Exp Parasitol, 3:403-416, 1954.

52. Markell EK, Voge M, John DT. Medical Parasitology. 7th ed. Philadelphia (Pa): WB Saunders Co., 1992.

53. Markell EK, John DT, Krotoski WA. Markell and Voges Medical Parasitology. 8th ed. Philadelphia (Pa): WB Saunders Co., 1999.

54. Martin LK, Beaver PC. Evaluation of Kato thick-smear technique for quantitative diagnosis of helminth infections. Am J Trop Med Hyg, 17:382-391, 1968.

55. Melvin DM, Smith JW. Intestinal parasitic infections Part I. Problems in laboratory diagnosis. Lab Med, 10:207-210, 1979.

56. Melvin DM, Brooke MM. Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites. 3rd ed. HHS publication No (CDC)82-8282. Atlanta: Laboratory Training and Consultation Division, Centers for Disease Control, 1982.

57. Nair CP. Rapid staining of intestinal amoebae in wet mounts. Nature, 172:1051, 1953.

58. Oshima T, Kagei N, Kibata M et al. A new effective ether sedimentation procedure for recovery of the eggs of *Clonorchis sinensis* and *Metagonimus yokogawai* in the stools. Jap J Parasit, 14:195, 1965. (Texto em Japonês)

59. Otto GF, Hewitt R, Strahan DE. A simplified zinc sulfate levitation method of fecal examination for protozoan cysts and hookworm eggs. Am J Hyg, 33(Sect D): 32-37, 1941.

60. Phillipson RF. Flotation technique for *Opisthorchis* and *Clonorchis* eggs. Trans R Soc Trop Med Hyg, 56:174, 1962.

61. Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examination. Bull US Army Med Dept, 8:326, 1948.

62. Ritchie LS, Lin S, Moon AP et al. The possible effects of pH and specific gravity on the ether-sedimentation procedure in concentrating eggs and cysts. Am J Trop Med Hyg, 9:444-449, 1960.

63. Sapero JJ, Lawless D, Strone CPA. An improved iodine-staining technique for routine laboratory diagnosis of intestinal protozoa. Science, 114:550-551, 1951.

64. Sapero JJ, Lawless D. The MIF stain-preservation technic for the identification of intestinal protozoa. Am J Trop Med Hyg, 2:613-619, 1953.

65. Setasuban P, Vajrasthira S. Soil Transmitted Helminthiasis and Laboratory Diagnosis. Bangokok: Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University; 1987.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

66. Sheather AL. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technic. J Comp Ther, 36:266-275, 1923.

67. Suzuki N. Diagnostic method in intestinal helminth infections. In: Yokogawa M. ed. Collect Papers on the Control of Soil-transmitted Helminthiases. Tokyo: APCO Research Group, 25-33, v.1, 1980.

68. Svensson R. Studies on human intestinal protozoa especially with regard to their demonstrability and the connexion between their distribution and hygienic conditions. Acta Med Scand, 87(Suppl 70):1-115, 1936.

69. Telemann W. Eine methode zur erleichterung der auffindung von parasiteneiern in den feces. Deutsch Med Wschr, 34:1510-1511, 1908.

70. Tomb JW, Helmy MM. The diagnosis of intestinal schistosomiasis by sedimentation. Trans Roy Soc Trop Med Hyg, 25:181-185, 1931.

71. Truant AL, Elliott SH, Kelly MY et al. Comparison of formalin-ethyl ether sedimentation, formalin-ethyl acetate sedimentation, and zinc sulfate flotation techniques for detection of intestinal parasites. J Clin Microbiol, 13:882-884, 1981.

72. Velat CA, Weinstein PP, Otto GF. A stain for the rapid differentiation of the trophozoites of the intestinal amoebae in fresh, wet preparations. Am J Trop Med, 30:43-51, 1950.

73. Weller TH, Dammin GJ. An improved method of examination of feces for diagnosis of intestinal schistosomiasis. Am J Clin Pathol, 15:96-500, 1945.

74. Wheatley WB. A rapid staining procedure for intestinal amebae and flagellates Microbiol, 10:852-853, 1979.

75. Willis HH. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. Med J Australia, 29:375-376, 1921.

76. Yang J, Scholten T. A fixative for intestinal parasites permitting the use of concentration and permanent staining procedures. Am J Clin Pathol, 67:300-304, 1977.

77. Young KH, Bullock SL, Melvin DM et al. Ethyl acetate as substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation procedure. J Clin Microbiol, 10:852-853, 1979.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CAPÍTULO 3



Preparação e Coloração de Esfregaços Permanentes

Geraldo Attilio De Carli

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O procedimento mais importante para exame e diagnóstico das infecções parasitárias por protozoários é a preparação de esfregaços fecais permanentes corados. Os esfregaços permanentes podem ser preparados com fezes frescas ou fezes preservadas pelos fixadores álcool polivinílico (fixador APV) e/ou acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF). Os esfregaços preparados com fezes preservadas pela formalina ou mertiolato-iodo-formaldeído (MIF) apresentam condições insatisfatórias. Os esfregaços permanentes corados oferecem inúmeras e importantes vantagens: a) permitem um minucioso estudo da morfologia dos organismos corados com a objetiva de imersão; b) raros ou pequenos organismos omitidos no exame direto a fresco podem ser identificados com facilidade; c) o exame é realizado adequadamente pelo microscopista; d) os esfregaços permanentes corados podem ser arquivados para estudos futuros como material de referência, e) os esfregaços positivos, quando necessário, podem ser submetidos a especialistas para uma identificação específica dos organismos.

As colorações permanentes são usadas para a identificação de trofozoítos, ocasionalmente de cistos e para a confirmação das espécies. Pequenos protozoários são freqüentemente observados nos esfregaços corados; entretanto, estes organismos são facilmente omitidos, quando se usa somente exame direto

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

ou técnicas de concentração. Por esta razão, esfregaços corados são recomendados para cada amostra fecal enviada ao laboratório para exame parasitológico de rotina.

A maioria dos métodos de coloração deriva da hematoxilina. A coloração permanente, mais satisfatória e a mais comum, empregada para o estudo dos protozários intestinais, é o método longo da hematoxilina férrica[9]. Várias modificações desse procedimento foram desenvolvidas: como a hematoxilina-tergitol[4]; hematoxilina férrica-ácido fosfotúngstico[19] e a hematoxilina-ácido clorídrico[18]. Para os trabalhos de rotina foram descritos métodos rápidos não derivados da hematoxilina, como o tricrômico de Wheatley[20]; modificação da coloração de Gomori[7]; a fucsina ácida-*fast green*[13]; o preto de clorazol[11,12] e as amostras preservadas com acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF)[21].

A maioria dos problemas encontrados na coloração permanente dos esfregaços fecais para a pesquisa de trofozoítos e cistos de protozoários ocorre quando os espécimes são muito velhos, ou quando os esfregaços são muito densos, ou as preparações são coradas antes de estarem secas ou fixadas inadequadamente[5].

Ao lado dos métodos padrões usados na coloração de esfregaços permanentes, a recente emergência de diferentes coccídios e microsporídios intestinais, como importantes parasitos em indivíduos com SIDA/AIDS ou em outras síndromes da imunodeficiência adquirida, tem conduzido o laboratório ao uso de procedimentos específicos de coloração para a identificação e diagnóstico desses organismos. Vários corantes derivados da fucsina-fenicada têm se mostrado altamente eficientes para o diagnóstico das infecções pelos coccídios (*Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli* e *Cyclospora cayetanensis*) e pelos microsporídios (*Encephalitozoon intestinalis* e *Enterocytozoon bieneusi*). Ver Capítulo 10 — Métodos de Coloração para Coccídios Intestinais (C*ryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* e *Isospora belli*) e Capítulo 11 — Métodos de Coloração para Microsporídios Intestinais (*Encephalitozoon intestinalis* e *Enterocytozoon bieneusi*).

COLORAÇÕES DERIVADAS DA HEMATOXILINA

As hematoxilinas são corantes nucleares, oferecendo vantagens por corar principalmente os núcleos e evidenciar as estruturas internas muito delicadas. Dois procedimentos básicos são observados durante a coloração: o progressivo e o regressivo. No progressivo, o corante é bem diluído e usado por bastante tempo, até que o organismo adquira uma coloração própria, de acordo com o seu grau de cromofilia. Não deve ser usado diferenciador. No regressivo, o corante não é diluído, ou é pouco diluído. Cora-se com excesso, para depois remover o corante com o diferenciador. É mais rápido e mais controlável, além de permitir a remoção das partículas do corante, que normalmente ficam aderidas à superfície do parasito[3]. O melhor processo de coloração é o clássico método longo da hematoxilina férrica, segundo Heidenhain[9] ou uma de suas modificações. Esses procedimentos usam a hematoxilina como corante e a solução de sulfato férrico amoniacal

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

($NH_4Fe[SO_4]_2.12H_2O$) como mordente e diferenciador. Esse método apresenta excelentes resultados de coloração quando todas as etapas do procedimento de coloração forem observadas, especialmente durante a diferenciação dos organismos. Os esfregaços podem ser preparados com amostras frescas ou preservadas com o líquido de Schaudinn, fixador álcool polivinílico (fixador APV) ou fixador acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF).

Coloração pela Hematoxilina Férrica, Segundo Heidenhain, Modificada por Burrows

A coloração pela hematoxilina férrica, segundo Heidenhain, modificada por Burrows[3], é indicada para a coloração de rotina de esfregaços fecais para a pesquisa de protozoários intestinais. Em uma das faces da lamínula (22 x 22mm), presa por uma de suas bordas a um pequeno pedaço de borracha de forma semicircular (15mm de diâmetro por 3mm de espessura), emulsificar pequena quantidade de fezes frescas em uma gota de solução salina a 0,85%. A lamínula é encaixada num entalhe feito na face plana do suporte, por meio de bisturi fino ou com lâmina de barbear. O suporte de borracha tem por finalidade facilitar a manipulação do preparado durante os diferentes tempos de fixação e coloração, além de permitir identificar o material, mediante a gravação de número numa das faces do referido fragmento de borracha (Fig. 3.1).

Esse procedimento de fixação da amostra fecal poderá ser realizado, também, em lâmina de microscopia. Para evitar a distorção dos protozoários presentes, não se deve permitir que os esfregaços sequem durante todo o tempo da coloração até a contagem final. *Uma série de placas de Petri ou cubas de Coplin deverão ser usadas para cada fase do processo de coloração* (Fig. 3.2).

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas).

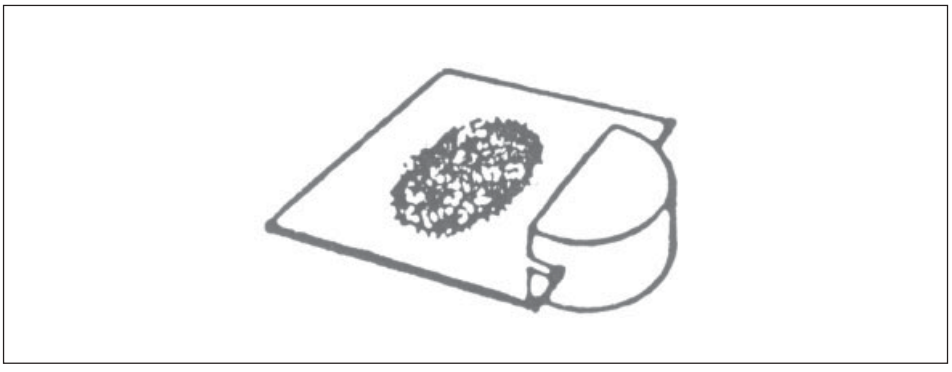


Fig. 3.1 — *Lamínula presa por uma de suas bordas a um pequeno pedaço de borracha de forma semicircular.*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

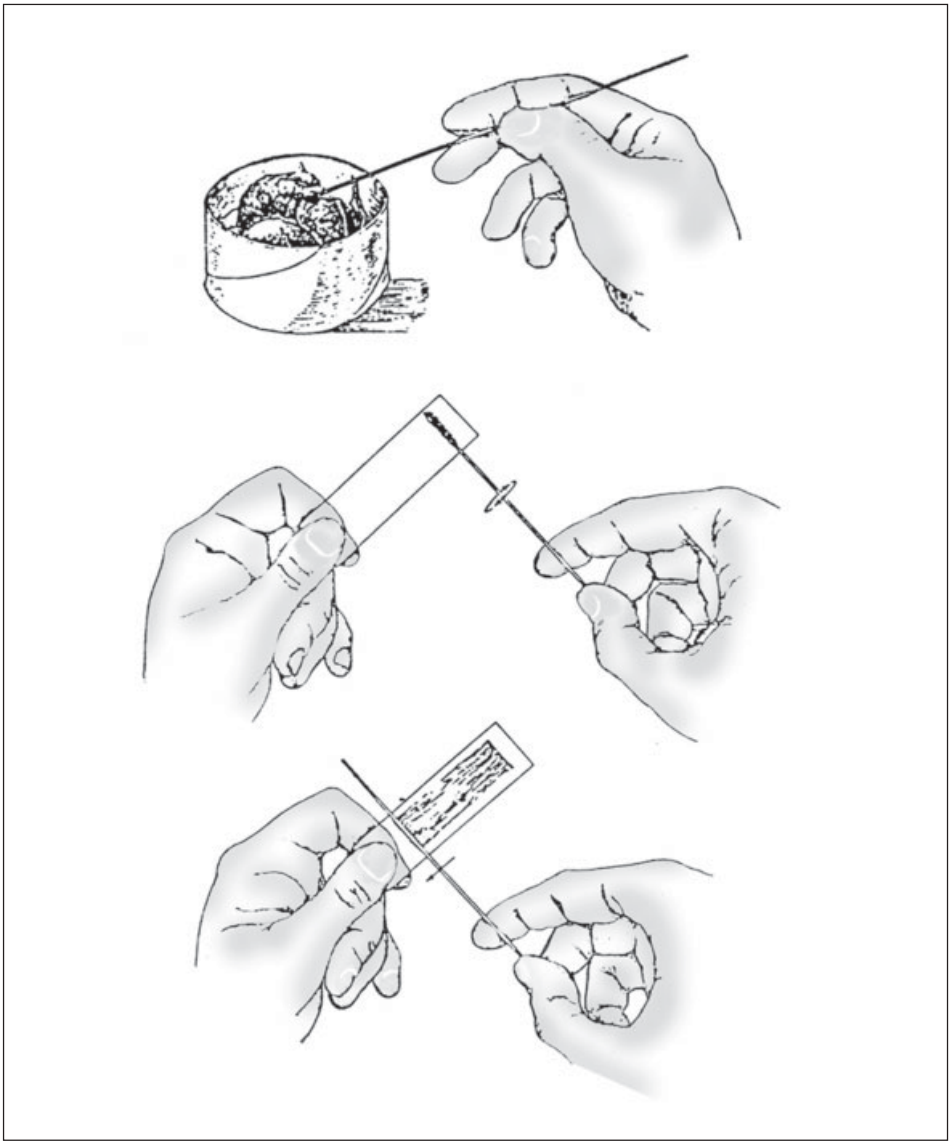


Fig. 3.2 — *Preparação de esfregaço fecal para coloração permanente. (Adaptada de Markell EK, Voge M, John DT. Medical Parasitology. 7th ed. Philadelphia (Pa): WB Saunders Co., 1992.)*

Reagentes

1. Fixador de Schaudinn (ver p. 11)
2. Solução de alúmen de ferro a 2% [$FeNH_4(SO_4)_2.12H_2O$]
3. Hematoxilina (CI 75290-Merck) ($C_{16}H_{14}O_6$)
4. Solução corante de hematoxilina a 0,5%
5. Álcool etílico a 50%, 70%, 95% (v/v) (C_2H_6O)
6. Álcool etílico absoluto + xilol (1:1)
7. Xilol (xileno) (C_8H_{10})
8. Resina sintética (*Cytoseal* 60)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Preparação das Soluções

1. Solução de Sulfato Férrico Amoniacal a 2% (alúmen de ferro)

Sulfato férrico amoniacal	2g
Água destilada-deionizada	100ml

• Dissolver os cristais violeta de sulfato férrico amoniacal (alúmen de ferro III) em água. Essa solução mordente deve ser preparada fresca imediatamente antes do uso e estocada à temperatura do refrigerador.

2. Solução Corante de Hematoxilina a 0,5%

a. Solução Estoque de Hematoxilina a 10%

Hematoxilina, forma cristalina	10g
Álcool etílico a 95% (v/v)	100ml

• Dissolver a hematoxilina em pequenas quantidades de álcool e, após, completar o volume até 100ml. Deixar "amadurecer" durante seis semanas, antes de diluir para uso. Depois de amadurecido, o corante apresenta uma coloração de vinho do Porto ou marrom-alaranjada forte. Estocar em frasco de vidro âmbar com tampa esmerilhada.

b. Solução Corante de Hematoxilina a 0,5%

Solução estoque de hematoxilina, amadurecida	5ml
Água destilada-deionizada	95ml

• Adicionar água na solução estoque de hematoxilina e misturar. Essa solução diluída a 0,5% não é estável e deve ser preparada diariamente ou quando for necessário.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
2. Fixador de Schaudinn, 10 minutos.
3. Álcool etílico a 70% iodado, três minutos.
4. Álcool etílico a 70%, dois minutos.
5. Álcool etílico a 50%, um minuto (pode ser omitido).
6. Água destilada, dois a três minutos (duas lavagens).
7. Solução de alúmen de ferro a 2% (mordente), 10 minutos.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

8. Água destilada, um minuto.
9. Solução corante de hematoxilina a 0,5%, cinco minutos.
10. Água destilada, um minuto.
11. Solução de alúmen de ferro a 2% (diferenciador), um minuto.
12. Água corrente, dois minutos (duas lavagens).
13. Observar a diferenciação ao microscópico. Se necessário repetir as etapas 10 e 11, deixando tempos maiores.
14. Quando o grau de diferenciação desejado é obtido, proceder à etapa seguinte.
15. Água corrente, várias lavagens, 30 minutos.
16. Álcool etílico a 50%, dois minutos (pode ser omitida).
17. Álcool etílico a 70%, um minuto.
18. Álcool etílico a 95%, um minuto.
19. Álcool etílico absoluto (1), um minuto.
20. Álcool etílico absoluto (2), um minuto.
21. Partes iguais de álcool etílico absoluto e xilol, um minuto.
22. Xilol (duas lavagens), um minuto cada.
23. Montagem com resina sintética (*Cytoseal* 60).

Observações

Com a finalidade de garantir melhor fixação, as lamínulas são colocadas na solução fixadora de Schaudinn com a face do esfregaço virada para baixo. O fixador de Schaudinn ataca o metal, por isso usam-se pinças de madeira.

Coloração pela Hematoxilina Férrica, Segundo Heidenhain, Modificada por Melvin e Brooke (FNP)

A coloração pela hematoxilina férrica, segundo Heidenhain, modificada por Melvin e Brooke[15], é indicada para a coloração de rotina de esfregaços fecais não preservados (FNP) para a pesquisa de protozoários intestinais. O método clássico fornece excelentes resultados e as fases podem ser consideravelmente reduzidas em tempo quando forem usados a quente o fixador, o mordente e o corante, sem perda nos detalhes de coloração.

Amostra

Material fecal não preservado (FNP) (fezes frescas).

Reagentes

1. Fixador de Schaudinn (ver p. 11)
2. Solução de álcool etílico a 70% (v/v) iodado

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

3. Solução de alúmen de ferro a 4% [$FeNH_4(SO_4)_2.12H_2O$]
4. Solução corante de hematoxilina a 0,5% ($C_{16}H_{14}O_6$)
5. Solução de alúmen de ferro a 2% [$FeNH_4(SO_4)_2.12H_2O$]
6. Solução saturada de ácido pícrico (CI 10305) [$C_6H_2(OH)(NO_2)_3$]
7. Solução aquosa saturada de carbonato de lítio (Li_2CO_3)
8. Xilol (xileno) (C_8H_{10})
9. Fenol (C_6H_6O), fundido a 44°C
10. Carbol-xilol (fenol-xileno)
11. Álcool etílico a 50%, 70%, 95% (v/v) (C_2H_6O)
12. Resina sintética (*Cytoseal* 60)

Preparação das Soluções

1. Solução de Álcool Etílico a 70% (v/v) Iodado

Adicionar quantidade suficiente de cristais de iodo em uma solução de álcool etílico (C_2H_6O) ou isopropílico (C_3H_8O) a 70% (v/v) até obter uma solução concentrada escura. Para a solução de trabalho diluir a solução estoque com álcool a 70%, até que seja obtida uma solução de cor forte semelhante ao vinho do Porto. A concentração exata não é importante, mas a solução não deve ser muito escura, já que o iodo poderia corar os protozoários e, subseqüentemente, interferir com a coloração da hematoxilina ou do tricrômico. Entretanto, se a solução for muito fraca, o mercúrio dos fixadores não é removido e os resíduos interferem no exame da preparação final.

2. Solução de Sulfato Férrico Amoniacal a 4% (alúmen de ferro)

Sulfato férrico amoniacal	4g
Água destilada-deionizada	100ml

• Dissolver os cristais violeta de sulfato férrico amoniacal (alúmen de ferro III) em água. Essa solução mordente deve ser preparada fresca imediatamente antes do uso e estocada à temperatura do refrigerador.

3. Solução de Sulfato Férrico Amoniacal a 2% (alúmen de ferro)

Diluir o mordente (solução a 4%) na proporção de 1:1 (v/v) em água destilada-deionizada. Esta solução diferenciadora se mantém estável por uma semana.

4. Solução Corante de Hematoxilina a 0,5%

Solução estoque de hematoxilina a 10%	5ml
Água destilada-deionizada	95ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

5. Solução Saturada de Ácido Pícrico

Ácido pícrico	2g
Água destilada-deionizada	100ml

• Adicionar o ácido pícrico à água. Agitar vigorosamente e deixar em repouso durante vários dias. Depois de quatro a cinco dias, alguns cristais do ácido pícrico podem permanecer não dissolvidos. Usar o líquido sobrenadante límpido ou filtrar a solução. Essa solução diferenciadora tem conservação indefinida e não apresenta problemas de estocagem.

6. Solução Aquosa Saturada de Carbonato de Lítio

Carbonato de lítio	1 ou 2g
Água destilada-deionizada	100ml

• Dissolver o carbonato de lítio em água até a completa dissolução do sal. Estocar em um frasco de vidro com tampa esmerilhada. A solução tem conservação indefinida.

7. Carbol-Xilol (Fenol-Xileno)

Adicionar um volume de fenol (C_6H_6O), fundido a 44°C, para três volumes de xilol (C_8H_{10}). Estocar a solução carbol-xilol em um frasco de vidro com tampa esmerilhada. O fenol líquido que contém água não poderá ser usado para a preparação da solução carbol-xilol. A solução estocada em frasco hermético, para evitar a hidratação, possui validade de 15 meses.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
2. Fixador de Schaudinn, cinco minutos a 50°C ou uma hora à temperatura ambiente. O esfregaço pode permanecer no fixador de Schaudinn durante dois a três dias.
3. Solução de álcool etílico a 70% iodado, cinco minutos.
4. Álcool etílico a 50%, três minutos.
5. Água corrente, três minutos.
6. Solução de alúmen de ferro a 4% (mordente) 10-20 minutos a 40-50°C ou 12-24 horas à temperatura ambiente.
7. Água destilada ou corrente, três minutos (duas lavagens no total).
8. Solução corante de hematoxilina a 0,5%, 5-10 minutos a 40-50°C ou 12-24 horas à temperatura ambiente.
9. Água destilada ou corrente, três minutos (total).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

10. Solução de alúmen de ferro a 1%-2% (diferenciador), observar ao microscópio, usualmente são requeridos 1-3 minutos ou mais ou

11. Solução aquosa saturada de ácido pícrico (diferenciador), 5-10 minutos; observar ao microscópio. Esta etapa é crítica. O processo deve ser controlado cuidadosamente. Em intervalos de meio, um, dois minutos ou mais, dependendo da solução diferenciadora usada, o esfregaço deve ser removido da solução, lavado vigorosamente em água corrente, ou parar o procedimento de diferenciação e examinar ao microscópio com pequeno e grande aumento. Repetir esta etapa até a obtenção de resultados ótimos. A diferenciação estará completa quando são visíveis os detalhes da estrutura dos organismos, como os núcleos; ou, se os organismos não podem ser visualizados, devido a uma coloração de fundo mais cinzenta do que preta. O tempo de diferenciação varia com a extensão do esfregaço, com os organismos e com outros fatores. Experiência e prática são necessárias para obter bons resultados. O ácido pícrico diferencia mais lentamente do que o alúmen férrico, o qual é o preferido e mais facilmente controlável.

12. Água corrente, 5-30 minutos, no mínimo (várias mudanças).

13. Álcool etílico a 70% e algumas gotas de solução saturada de carbonato de lítio (para cada cuba de *Coplin*), três minutos.

14. Álcool etílico a 95%, cinco minutos.

15. Carbol-xilol, cinco minutos.

16. Xilol, três minutos.

17. Montagem com resina sintética (*Cytoseal* 60).

Coloração pela Hematoxilina Férrica, Segundo Heidenhain, Modificada por Melvin e Brooke (FP)

A coloração pela hematoxilina férrica, segundo Heidenhain, modificada por Melvin e Brooke[15], é indicada para a coloração de rotina de esfregaços fecais preservados (FP) para a pesquisa de protozoários intestinais. A coloração de esfregaços secos fixados pelo fixador APV é essencialmente o mesmo processo usado para os esfregaços fecais frescos. Exceto para uma variação no tempo requerido a certas etapas e a omissão da etapa 1, ou seja, a fixação pelo líquido de Schaudinn, o uso da solução fixadora APV torna uma fixação adicional desnecessária.

Amostra

Material fecal preservado pelo fixador álcool polivinílico (fixador APV).

Reagentes

1. Fixador álcool polivinílico (fixador APV) (p. 14)
2. Solução de álcool etílico a 70% iodado
3. Álcool etílico a 50%, 70%, 95% (v/v) (C_2H_6O)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

4. Solução de alúmen de ferro a 4% [$FeNH_4(SO_4)_2.12H_2O$]
5. Solução corante de hematoxilina a 0,5% ($C_{16}H_{14}O_6$)
6. Solução saturada de ácido pícrico [$C_6H_2(OH)(NO_2)_3$]
7. Solução aquosa saturada de carbonato de lítio (Li_2CO_3)
8. Carbol-xilol
9. Xilol (xileno) (C_8H_{10})

Preparações das Soluções

1. Solução de Álcool Etílico a 70% (v/v) Iodado

Adicionar quantidade suficiente de cristais de iodo em uma solução de álcool etílico (C_2H_6O) ou isopropílico (C_3H_8O) a 70% (v/v) até obter uma solução concentrada escura. Para a solução de trabalho diluir a solução estoque com álcool a 70%, até que seja obtida uma solução de cor forte semelhante ao vinho do Porto. A concentração exata não é importante, mas a solução não deve ser muito escura, já que o iodo poderia corar os protozoários e, subseqüentemente, interferir com a coloração da hematoxilina ou do tricrômico. Entretanto, se a solução for muito fraca, o mercúrio dos fixadores não é removido e os resíduos interferem no exame da preparação final.

2. Solução de Sulfato Férrico Amoniacal a 4% (alúmen de ferro)

Sulfato férrico amoniacal	4g
Água destilada-deionizada	100ml

• Dissolver os cristais violeta de sulfato férrico amoniacal (alúmen de ferro III) em água. Essa solução mordente deve ser preparada fresca imediatamente antes do uso e estocada à temperatura do refrigerador.

3. Solução Corante de Hematoxilina a 0,5%

Solução estoque de hematoxilina a 10%	5ml
Água destilada-deionizada	95ml

4. Solução Saturada de Ácido Pícrico

Ácido pícrico	2g
Água destilada-deionizada	100ml

• Adicionar o ácido pícrico à água. Agitar vigorosamente e deixar em repouso durante vários dias. Depois de quatro a cinco dias, alguns cristais

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

do ácido pícrico podem permanecer não dissolvidos. Usar o líquido sobrenadante límpido ou filtrar a solução. Essa solução diferenciadora tem conservação indefinida e não apresenta problemas de estocagem.

5. Solução Aquosa Saturada de Carbonato de Lítio

Carbonato de lítio	1 ou 2g
Água destilada-deionizada	100ml

• Dissolver o carbonato de lítio em água até a completa dissolução do sal. Estocar em um frasco de vidro com tampa esmerilhada. A solução tem conservação indefinida.

6. Carbol-Xilol (Fenol-xileno)

Adicionar um volume de fenol (C_6H_6O), fundido a 44°C, para três volumes de xilol (C_8H_{10}). Estocar a solução carbol-xilol em um frasco de vidro com tampa esmerilhada. O fenol líquido que contém água não poderá ser usado para a preparação da solução carbol-xilol. A solução estocada em frasco hermético, para evitar a hidratação, possui validade de 15 meses.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
2. Álcool etílico a 70% iodado, 20 minutos.
3. Álcool etílico a 50%, 10 minutos.
4. Água corrente, cinco minutos.
5. Solução de alúmen de ferro a 4% (mordente), 8-12 horas.
6. Água destilada ou corrente, três minutos (duas lavagens no total).
7. Solução corante de hematoxilina a 0,5%, 8-12 horas (ou toda a noite).
8. Água corrente, três minutos (duas lavagens no total).
9. Solução saturada de ácido pícrico (diferenciador), 15-20 minutos, ou etapa 9 do procedimento padrão.
10. Água corrente, ou várias lavagens, 30 minutos.
11. Álcool etílico a 70% e mais algumas gotas de solução saturada de carbonato de lítio (para cada cuba de *Coplin*), 10 minutos.
12. Álcool etílico a 95%, 10 minutos.
13. Carbol-xilol, 10 minutos.
14. Xilol, 10 minutos.
15. Montagem com resina sintética (*Cytoseal* 60).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Características da Coloração (Hematoxilina Férrica, Segundo Heidenhain)

Os organismos corados apresentam cor azulada ou cinzenta com estruturas nucleares pretas. Os corpos cromatóides dos cistos das amebas e inclusões, tais como bactérias ou hemácias no citoplasma dos trofozoítos, coram-se de preto. O material de fundo, usualmente, cora-se em azul-cinzento. As formas císticas e trofozoíticas de protozoários geralmente não são distorcidas, com exceção de *Chilomastix* e *Trichomonas*, que se apresentam redondas e com aparência atípica. Organismos não corados podem indicar uma fixação inadequada. Com fezes frescas a fixação pode ser melhorada pelo aquecimento do fixador até 56°C e fixação durante 5-10 minutos. A fixação à temperatura ambiente ou a frio com fixador fresco oferece mais dificuldades na coloração dos organismos. Com exceção da *Entamoeba coli*, são suficientes 30 minutos de fixação a frio. Para garantir uma completa fixação dos cistos da *E. coli* são necessárias duas a três horas à temperatura ambiente ou 30 minutos a 56°C. Os cistos imaturos e jovens são fixados mais facilmente do que os cistos velhos; os trofozoítos são freqüentemente fixados em dois a três minutos. Leucócitos mononucleares e polimorfonucleares, *Blastocystis hominis*, leveduras e fungos, podem dificultar o diagnóstico, a menos que o microscopista esteja treinado na diferenciação morfológica de protozoários. Os cistos de *Entamoeba histolytica* e *E. coli*, fixados pela solução fixadora APV e corados pela coloração anteriormente descrita, podem se apresentar distorcidos.

Coloração pela Hematoxilina Férrica-Ácido Fosfotúngstico

O método de Tompkins e Miller[19] é um procedimento rápido de coloração para propósitos de diagnóstico. A diferenciação é autolimitada e não necessita ser controlada pelo microscópio como o método clássico. A reação do corante é similar à descrita na coloração de Heidenhain, exceto no que diz respeito às lâminas, que apresentam uma aparência azulada. Esse procedimento produz melhores resultados com esfregaços fecais frescos do que com preparações de fezes preservadas com o fixador APV.

Amostra

Material fecal fresco ou preservado pelo fixador de Schaudinn.

Reagentes

1. Fixador de Schaudinn (ver p. 11)
2. Solução de álcool etílico a 70% iodado
3. Solução de alúmen de ferro a 4% [$FeNH_4(SO_4)_2.12H_2O$]
4. Solução corante de hematoxilina a 0,5% ($C_{16}H_{14}O_6$)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

5. Solução de ácido fosfotúngstico a 2% ($24WO_3.2H_3PO_4.48H_2O$)
6. Solução aquosa saturada de carbonato de lítio (Li_2CO_3)
7. Carbol-xilol (fenol-xileno)
8. Álcool etílico a 50%, 70%, 95% (v/v)
9. Xilol (xileno) (C_8H_{10})
10. Resina sintética (*Cytoseal* 60)

Preparação das Soluções

1. Solução de Álcool Etílico a 70% Iodado

Adicionar quantidade suficiente de cristais de iodo em uma solução de álcool etílico (C_2H_6O) ou isopropílico (C_3H_8O) a 70% (v/v) até obter uma solução concentrada escura. Para a solução de trabalho diluir a solução estoque com álcool a 70%, até que seja obtida uma solução forte semelhante ao vinho do Porto. A concentração exata não é importante, mas a solução não deve ser muito escura, já que o iodo poderia corar os protozoários e, subseqüentemente, interferir com a coloração da hematoxilina ou do tricrômico. Entretanto, se a solução for muito fraca, o mercúrio dos fixadores não é removido e os resíduos interferem no exame da preparação final.

2. Solução de Sulfato Férrico Amoniacal a 4% (alúmen de ferro)

Sulfato férrico amoniacal	4g
Água destilada-deionizada	100ml

• Dissolver os cristais violeta de sulfato férrico amoniacal (alúmen de ferro III) em água. Essa solução mordente deve ser preparada fresca imediatamente antes do uso e estocada à temperatura do refrigerador.

3. Solução Corante de Hematoxilina a 0,5%

Solução estoque de hematoxilina a 10%	5ml
Água destilada-deionizada	95ml

4. Solução de Ácido Fosfotúngstico a 2%

Ácido fosfotúngstico	2g
Água destilada-deionizada	100ml

• Dissolver o ácido fosfotúngstico em água. Estocar em frasco de vidro com tampa esmerilhada. Conservação indefinida.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

5. Solução Aquosa Saturada de Carbonato de Lítio

Carbonato de lítio	1 ou 2g
Água destilada-deionizada	100ml

• Dissolver o carbonato de lítio em água até a completa dissolução do sal. Estocar em um frasco de vidro com tampa esmerilhada. A solução tem conservação indefinida.

6. Carbol-Xilol (Fenol-Xileno)

Adicionar um volume de fenol (C_6H_6O), fundido a 44°C, para três volumes de xilol (C_8H_{10}). Estocar a solução carbol-xileno em um frasco de vidro com tampa esmerilhada. O fenol líquido que contém água não poderá ser usado para a preparação da solução carbol-xileno. A solução estocada em frasco hermético, para evitar a hidratação, possui validade de 15 meses.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
2. Fixador de Schaudinn, cinco minutos a 50°C, ou uma hora à temperatura ambiente.
3. Álcool etílico a 70% iodado, cinco minutos.
4. Álcool etílico a 50%, três minutos.
5. Água corrente, três minutos.
6. Solução de alúmen de ferro a 4% (mordente), 3-5 minutos à temperatura ambiente.
7. Água destilada ou corrente, um minuto.
8. Solução corante de hematoxilina a 0,5%, um minuto à temperatura ambiente.
9. Água destilada ou corrente, um minuto.
10. Solução de ácido fosfotúngstico a 2% (diferenciador), dois ou mais minutos.
11. Água corrente, cinco minutos (várias lavagens).
12. Álcool etílico a 70% e mais algumas gotas de solução saturada de carbonato de lítio (para cada cuba de *Coplin*), três minutos.
13. Álcool etílico a 95%, três minutos.
14. Carbol-xilol, cinco minutos.
15. Xilol, três minutos.

Características da Coloração

Os organismos coram-se como foi descrito na coloração da hematoxilina-férrica, segundo Heidenhain, mas as preparações são mais azuis do que aquelas obtidas pelo método longo.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Coloração pela Hematoxilina Férrica-Ácido Clorídrico

O método Spencer e Monroe, coloração pela hematoxilina férrica-ácido clorídrico[18], é mais longo do que a coloração do tricrômico de Wheatley[20]. O procedimento descrito não requer diferenciador, apesar da experiência mostrar que nas colorações mais longas o uso da solução de ácido clorídrico a 0,5%, como descorante, melhora a diferenciação dos organismos.

Amostra

Material fecal fresco, ou preservado no fixador álcool polivinílico (fixador APV), ou no fixador acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF).

Reagentes

1. Fixador acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF) (ver p 21), ou fixador álcool polivinílico (fixador APV) (ver p. 14)
2. Solução de iodo de D'Antoni
3. Hematoxilina, forma cristalina (CI 75290) ($C_{16}H_{14}O_6$)
4. Solução corante de trabalho de hematoxilina-férrica, Spencer-Monroe
5. Álcool etílico a 70%, 95% (v/v) (C_2H_6O)
6. Álcool etílico absoluto (C_2H_6O)
7. Ácido clorídrico (HCl)
8. Iodo, cristais (I_2)
9. Iodeto de potássio (KI)
10. Sulfato ferroso amoniacal [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$]
11. Sulfato férrico amoniacal [$FeNH_4(SO_4)_2.12H_2O$)
12. Xilol (xileno) (C_8H_{10}) ou toluol (tolueno) (C_7H_8)
13. Resina sintética (*Cytoseal* 60)

Preparação das Soluções

1. Solução de Iodo de D'Antoni

Iodo, cristais	1,5g
Iodeto de potássio	1g
Água destilada-deionizada	100ml

Preparação

• Dissolver 1g de iodeto de potássio em 100ml de água. Adicionar lentamente 1,5g de cristais de iodo e agitar a mistura até a completa dissolu-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

ção. Filtrar e estocar em frasco de cor âmbar com tampa esmerilhada, ao abrigo da luz. Preparar novas soluções depois de 10 a 14 dias. Indicar a data de validade no rótulo do frasco.

2. Solução Corante de Trabalho de Hematoxilina Férrica

Solução I

Hematoxilina, forma cristalina	10g
Álcool etílico absoluto	1.000ml

• Dissolver a hematoxilina no álcool etílico absoluto. Estocar em frasco de vidro de cor âmbar. Deixar "amadurecer" durante seis meses, ou durante uma semana exposta ao sol.

Solução II

Sulfato ferroso amoniacal	10g
Sulfato férrico amoniacal	10g
Ácido clorídrico concentrado	10ml
Água destilada-deionizada	1.000ml

Solução de Trabalho

• Misturar partes iguais das soluções I e II. Esta solução deve ser preparada todas as semanas.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
2. Preparar esfregaços com material fresco, ou preservado pelo SAF (início na etapa 4), ou fixador APV.
3. Álcool etílico a 70%, cinco minutos.
4. Álcool etílico a 70%, contendo solução de iodo de D'Antoni (cor de vinho do Porto), dois a cinco minutos.
5. Álcool etílico a 70%, cinco minutos.
6. Água corrente, 10 minutos.
7. Solução corante de trabalho de hematoxilina férrica, quatro a cinco minutos.
8. Água corrente, 10 minutos.
9. Álcool etílico a 70%, cinco minutos.
10. Álcool etílico a 95%, cinco minutos.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

11. Álcool etílico absoluto (1), cinco minutos.
12. Álcool etílico absoluto (2), cinco minutos.
13. Xilol ou tolueno (1), cinco minutos.
14. Xilol ou tolueno (2), cinco minutos.
15. Montagem com resina sintética (*Cytoseal* 60).

***** Na etapa 4 inicia a coloração para os esfregaços fixados com o SAF.

Características da Coloração

Os organismos se coram de azul-cinzento ao preto, como também o material de fundo. As estruturas nucleares, os corpos de inclusão e o citoplasma adjacente apresentam-se em preto.

Controle de Qualidade: Hematoxilina Férrica

1. Ver o controle de qualidade (CQ) dos fixadores de Schaudinn, APV e SAF.

2. Os espécimes fecais usados para o CQ podem ser igualmente fezes fixadas positivas para protozoários, ou negativas, preservadas pelo fixador APV, nas quais foram adicionados leucócitos humanos. Os esfregaços preparados para o CQ de espécimes positivos fixados com APV, ou contendo leucócitos humanos, devem ser usados quando um novo lote do corante é preparado, ou, no mínimo, uma vez por semana. Culturas de protozoários podem também ser usadas.

3. O esfregaço para CQ deve ser incluído quando for usado um novo número de lote de reagente, ou forem adicionados novos reagentes nas cubas de *Coplin*. Depois da lavagem das cubas, o procedimento deve ser repetido no mínimo semanalmente.

4. Quando o xilol estiver turvo ou houver uma acumulação de água no fundo das cubas de *Coplin*, deve ser usado novo etanol e xilol a 100%.

5. As cubas de *Coplin* devem ser mantidas fechadas para evitar a evaporação dos reagentes.

6. Dependendo do número de esfregaços corados, as soluções corantes básicas devem ser trocadas quando necessário.

7. Os organismos corados apresentam cor azulada ou cinzenta com estruturas nucleares pretas. Os corpos cromatóides dos cistos das amebas e inclusões, tais como bactérias ou hemácias no citoplasma dos trofozoítos, coram-se de preto. O material de fundo, usualmente, cora-se em azul-cinzento.

8. *Slides*, fotografias e livros de referência devem estar à disposição no laboratório de Parasitologia.

9. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. Colocar as objetivas e as oculares originais no microscópio durante a calibração. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

10. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[2,5,8,16].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

COLORAÇÕES PELO TRICRÔMICO

Alguns parasitologistas preferem outras colorações do que a da hematoxilina, porque elas exigem menores tempos. Entretanto, outros escolhem a hematoxilina, apesar da maior permanência da preparação e do tempo requerido na coloração dos esfregaços. Os métodos permanentes de coloração, não derivados da hematoxilina, revelam o máximo de detalhes e permitem uma identificação mais segura do que qualquer outro procedimento. A coloração da hematoxilina férrica é um processo excelente, mas bastante difícil, o qual deve ser realizado por um técnico experiente para a obtenção de bons resultados. A coloração do tricrômico é recomendada para os trabalhos de rotina. Este é um procedimento de coloração bastante simples e os resultados obtidos são uniformes, mesmo com material fecal fresco, preservado com o fixador APV, ou com o líquido de Schaudinn. O método do tricrômico demonstra detalhes aceitáveis do citoplasma e do núcleo.

Os métodos do tricrômico de Wheatley[20], uma modificação da coloração de Gomori[7] e o de Yang e Scholten[21] são procedimentos indicados para os trabalhos de rotina. A coloração de Wheatley[20] é indicada para material fecal fresco ou preservado, tanto quanto pelo líquido de Schaudinn e pelo fixador APV, enquanto a de Yang e Scholten[21] serve para fezes fixadas em SAF.

Método de Wheatley

O procedimento de Gomori[7], modificado por Wheatley[20], é uma coloração rápida e simples, a qual fornece ótimos resultados para os propósitos de rotina. Esse método não necessita corar em excesso e diferenciar os organismos para revelar os detalhes morfológicos dos parasitos, como também não é necessário o uso de mordente antes da coloração. Burrows[3] afirma, também, que a coloração apresenta bons resultados com as amebas e flagelados e para estes protozoários não é requerida uma ação primária do mordente com uma diferenciação pós-coloração. Entretanto, para trabalhos práticos, a descoloração e a diferenciação dos esfregaços apresentam melhores resultados. A solução de coloração é estável e pode ser usada várias vezes, repondo-se o volume pela adição da solução estoque. A coloração do material fresco ou preservado pelo fixador APV difere principalmente no aumento do tempo necessário pelos esfregaços fixados e na omissão das etapas de fixação, desde que a amostra já esteja fixada na solução fixadora APV.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas).

Reagentes

1. Fixador de Schaudinn (ver p. 11)
2. Álcool etílico a 70%, 90%, 95% (v/v) (C_2H_6O)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

3. Álcool etílico absoluto (C_2H_6O)
4. *Chromotrope* 2R (CI 16570) ($C_{16}H_{10}N_2Na_2O_8S_2$)
5. *Light green* SF (CI 42095) ($C_{37}H_{34}N_2O_9S_3Na_2$)
6. *Fast green* FCF (CI 42053) ($C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3$)
7. Ácido fosfotúngstico ($24WO_3.2H_3PO_4.48H_2O$)
8. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
9. Carbol-Xilol (Fenol-xileno)
10. Xilol (Xileno) (C_8H_{10})
11. Resina sintética (*Cytoseal* 60)

Preparação das Soluções

1. Corante Tricrômico, segundo Brooke

Chromotrope 2R	0,6g
Light green SF	0,15g
Fast green FCF	0,15g
Ácido fosfotúngstico	0,7g
Ácido acético glacial	1ml
Água destilada-deionizada	100ml

• Colocar os componentes secos em um *beaker* e adicionar 1ml de ácido acético glacial. Agitar a mistura e deixar em repouso 30 minutos para "amadurecer". Adicionar 100ml de água. O corante é estável e não deve ser diluído. Apresenta uma cor púrpura forte quase preta.

2. Solução de Álcool-Ácido

Ácido acético glacial	4,5ml
Álcool etílico a 90% (v/v)	995,5ml

• Adicionar o ácido acético ao álcool etílico e estocar em frasco de vidro com tampa esmerilhada. Conservação indefinida.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
2. Fixador de Schaudinn, cinco minutos a 50°C, ou uma hora à temperatura ambiente.
3. Solução de álcool etílico a 70% iodado, um minuto.
4. Álcool etílico a 70% (1), um minuto.
5. Corante tricrômico, 2-8 minutos.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

6. Solução álcool-ácido, 5-10 segundos.
7. Álcool etílico a 95% (1), lavar rapidamente.
8. Álcool etílico a 95% (2), lavar rapidamente.
9. Álcool etílico absoluto ou carbol-xileno, um minuto.
10. Xilol, 1-3 minutos.
11. Montagem com resina sintética (*Cytoseal* 60).

Método de Brooke

O método de coloração de esfregaços fecais de Brooke[1] é indicado para a pesquisa de protozoários intestinais em esfregaços preservados pelo fixador álcool polivinílico (fixador APV).

Amostra

Material fecal preservado pelo fixador álcool polivinílico (fixador APV).

Reagentes

1. Fixador álcool polivinílico (fixador APV) (ver p. 14)
2. Solução de álcool etílico a 70% iodado
3. Corante tricrômico, segundo Brooke
4. Solução de álcool-ácido
5. Álcool etílico a 70%, 95% (v/v) (C_2H_6O)
6. Álcool isopropílico (C_3H_8O)
7. Carbol-xilol
8. Fenol (C_6H_6O), fundido a 44°C
9. Xilol (xileno) (C_8H_{10})
10. Resina sintética (*Cytoseal* 60)

Preparação das Soluções

1. Solução de Álcool Etílico a 70% Iodado

Adicionar quantidade suficiente de cristais de iodo em uma solução de álcool etílico (C_2H_6O) ou isopropílico (C_3H_8O) a 70% (v/v) até obter uma solução concentrada escura. Para a solução de trabalho diluir a solução estoque com álcool a 70% até que seja obtida uma solução de cor forte semelhante ao vinho do Porto. A concentração exata não é importante, mas a solução não deve ser muito escura, já que o iodo poderia corar os protozoários e, subseqüentemente, interferir com a coloração da hematoxilina ou do tricrômico. Entretanto, se a solução for muito fraca, o mercúrio dos fixadores não é removido e os resíduos interferem no exame da preparação final.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Corante Tricrômico, segundo Brooke

Chromotrope 2R	0,6g
Light green SF	0,15g
Fast green FCF	0,15g
Ácido fosfotúngstico	0,7g
Ácido acético glacial	1ml
Água destilada-deionizada	100ml

• Colocar os componentes secos em um *beaker* e adicionar 1ml de ácido acético glacial. Agitar a mistura e deixar em repouso 30 minutos para "amadurecer". Adicionar 100ml de água. O corante é estável e não deve ser diluído. Apresenta uma cor púrpura forte, quase preta.

3. Solução de Álcool-Ácido

Álcool etílico a 90% (v/v)	995,5ml
Ácido acético glacial	4,5ml

• Adicionar o ácido acético ao álcool etílico e estocar em frasco de vidro com tampa esmerilhada. Conservação indefinida.

4. Carbol-Xilol

Adicionar um volume de fenol (C_6H_6O), fundido a 44°C, para três volumes de xilol (C_8H_{10}). Estocar a solução carbol-xileno em um frasco de vidro com tampa esmerilhada. O fenol líquido que contém água não poderá ser usado para a preparação da solução carbol-xileno. A solução estocada em frasco hermético, para evitar a hidratação, possui validade de 15 meses.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
2. Solução de álcool etílico a 70% iodado, 10 a 20 minutos.
3. Álcool etílico a 70% (1), 3-5 minutos.
4. Álcool etílico a 70% (2), 3-5 minutos.
5. Corante tricrômico, 6-8 minutos.
6. Solução de álcool etílico a 90% acidificado.
7. Álcool etílico a 95% (1), lavar para remover o ácido descorado.
8. Álcool etílico a 95% (2), cinco minutos.
9. Carbol-Xilol, 5-10 minutos.
10. Xilol, 10 minutos.
11. Montagem com resina sintética (*Cytoseal* 60).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Características da Coloração

O citoplasma dos cistos e trofozoítos realmente fixados e bem corados tomam a cor verde-azulada, com um matiz purpúreo. Ocasionalmente, os cistos da *E. coli* podem apresentar uma coloração mais levemente púrpura do que os cistos das outras espécies. A cromatina nuclear, corpos cromatóides, células vermelhas e bactérias coram-se de vermelho ou púrpura-escuro. As outras partículas, como leveduras e fungos, geralmente adquirem um matiz verde, mas freqüentemente ocorrem reações na gradação de cores das partículas ingeridas. O material de fundo, usualmente, cora-se em verde, contrastando, portanto, com o protozoário. Cistos não corados e aqueles predominantemente vermelhos são com mais freqüência associados com uma fixação incompleta. Coloração insatisfatória de organismos, obtida de espécimes submetidos ao fixador APV, indica, usualmente, fixação incompleta associada com emulsificação insuficiente. Uma emulsificação vigorosa das fezes pastosas produz um rendimento decisivo na coloração dos cistos e dos trofozoítos. Formas degenerativas coram-se em verde-claro, enquanto organismos fracamente ou muito corados também podem apresentar-se em verde. Ovos e larvas tomam a cor vermelha e contrastam fortemente com o verde do segundo plano. A membrana muito fina de alguns ovos, com muita freqüência, se rompe durante a montagem com as resinas sintéticas, pois alguns estágios de diagnósticos podem ser retidos, especialmente se o esfregaço é examinado imediatamente. Leucócitos mononucleares, polimorfonucleares e *B. hominis* apresentam os mesmos problemas de diagnóstico mostrados quando corados pela hematoxilina. Como os protozoários, as células de pus e de tecidos apresentam-se em vermelho e o citoplasma em verde. Entretanto, o citoplasma dessas células exibe uma cor mais esverdeada do que a dos protozoários.

Observações

1. As amostras fecais frescas poderão ser fixadas no líquido de Schaudinn ou no fixador APV. Preparar, sempre, dois esfregaços. O material fecal conservado no fixador APV poderá ser fixado logo após a colheita ou imediatamente antes da coloração pelo tricrômico.

2. Os esfregaços sempre deverão ser drenados entre uma solução e outra. Quando uma lâmina é removida de uma solução, contatar a extremidade em papel toalha, durante 2-4 segundos para remover o excesso do líquido. Após, continuar a coloração. Este procedimento é obrigatório para evitar que as soluções se tornem contaminadas com material líquido anterior e propiciar no final uma coloração de difícil observação.

3. O contato entre o álcool-ácido (etapa 5) e o esfregaço determina a continuidade da descoloração. Por isso o tempo deverá ser de alguns segundos entre a remoção do álcool-ácido e a lavagem no álcool a 95% (etapa 6). Uma descoloração rápida no álcool-ácido (10 segundos) pode causar uma diferenciação incompleta; é necessária uma descoloração longa, principalmente com as formas trofozoíticas grandes como as da *E. coli*.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Método de Yang e Scholten

O método de coloração de esfregaços fecais de Yang e Scholten[21] é indicado para a pesquisa de protozoários intestinais em esfregaços preservados pelo fixador acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF).

Amostra

Material fecal fresco ou preservado no fixador acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF).

Reagentes

1. Fixador acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF) (ver p.21)
2. Solução de iodo de D'Antoni
3. Corante tricrômico
4. Solução de álcool etílico a 90% (v/v) acidificado com 1% de ácido acético glacial
5. Álcool etílico a 70% (v/v) (C_2H_6O)
6. Álcool etílico absoluto (C_2H_6O)
7. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
8. *Chromotrope* 2R (CI 16570) ($C_{16}H_{10}N_2Na_2O_8S_2$)
9. *Light green* SF (CI 42095) ($C_{37}H_{34}N_2O_9S_3Na_2$)
10. Ácido fosfotúngstico ($24WO_3.2H_3PO_4.48H_2O$)
11. Resina sintética (*Cytoseal* 60)

Preparação das Soluções

1. Fixador Acetato de Sódio-Ácido Acético-Formaldeído (SAF) (ver p. 21)

2. Solução de Iodo de D'Antoni (ver p. 39)

Corante Tricrômico, segundo Garcia e Bruckner[5]

Chromotrope 2R	0,6g
Light green SF	0,3g
Ácido fosfotúngstico	0,7g
Ácido acético glacial	1ml
Água destilada-deionizada	100ml

• Colocar os componentes secos em um *beaker* e adicionar 1ml de ácido acético glacial. Agitar a mistura e deixar em repouso 30 minutos para "ama-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

durecer". Adicionar 100ml de água. O corante é estável e não deve ser diluído. Apresenta uma cor púrpura forte quase preta.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Preparação da Amostra

1. Agitar vigorosamente a mistura SAF-fezes e filtrar a suspensão através de gaze, levemente umedecida com água corrente, dobrada duas vezes, e coletar o filtrado em tubo de centrífuga de 15ml com fundo redondo.

2. Centrifugar (500 x *g*/1min), decantar o líquido sobrenadante e preparar o esfregaço com o sedimento (0,5-1,0ml). Se necessário, ressuspender o sedimento com solução salina a 0,85%. O esfregaço SAF-fezes pode também ser pós-fixado no líquido de Schaudinn antes da coloração.

3. Depois de seco, o esfregaço poderá ser colocado diretamente no álcool etílico a 70% (etapa 4 do processo de coloração). A etapa álcool-iodo poderá ser eliminada.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas em todas as etapas da coloração.
2. Preparar um esfregaço fresco com fixador SAF.
3. Álcool etílico a 70%, cinco minutos.
4. Álcool etílico a 70% iodado, 2-5 minutos, contendo gotas da solução de iodo de D'Antoni (cor de vinho do Porto).
5. Álcool etílico a 70% (1), cinco minutos, nesta etapa inicia-se a coloração dos esfregaços fixados com SAF.
6. Álcool etílico a 70% (2), 2-5 minutos.
7. Corante tricrômico, 10 minutos.
8. Solução de álcool etílico a 90%, acidificado com solução de 1% de ácido acético, três segundos.
9. Álcool etílico absoluto, lavar.
10. Álcool etílico absoluto (1), 2-5 minutos.
11. Álcool etílico absoluto (2), 2-5 minutos.
12. Xilol ou Toluol (1), 2-5 minutos.
13. Xilol ou Toluol (2), 2-5 minutos. Nesta fase o esfregaço poderá permanecer em contato com os reagentes por várias horas ou por toda a noite.
14. Montagem com resina sintética (*Cytoseal* 60).

Controle de Qualidade: Colorações pelo Tricrômico

1. Ver o controle de qualidade (CQ) dos fixadores de Schaudinn, APV e SAF.

2. Os espécimes fecais usados para o CQ podem ser igualmente fezes fixadas positivas para protozoários, ou negativas, preservadas pelo fixador

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

APV, nas quais foram adicionados leucócitos humanos. Os esfregaços preparados para o CQ de espécimes positivos fixados com APV, ou contendo leucócitos, devem ser usados quando um novo corante é preparado, ou no mínimo uma vez por semana. Culturas de protozoários podem também ser usadas.

3. O esfregaço para CQ deve ser incluído quando for usado um novo número de lote do reagente ou forem adicionados novos reagentes nas cubas de *Coplin*. Depois da lavagem das cubas o procedimento deve ser repetido no mínimo semanalmente.

4. Quando o xilol estiver turvo ou houver uma acumulação de água no fundo das cubas de *Coplin*, usar novo etanol e xilol a 100%.

5. As cubas de *Coplin* devem ser mantidas fechadas para evitar a evaporação dos reagentes.

6. Dependendo do número de esfregaços corados, as soluções corantes básicas devem ser trocadas quando necessário.

7. O citoplasma dos cistos e trofozoítos realmente fixados e bem corados tomam a cor verde-azulada, com um matiz purpúreo. Ocasionalmente, os cistos da *E. coli* podem apresentar uma coloração mais levemente púrpura do que os cistos das outras espécies. A cromatina nuclear, corpos cromatóides, células vermelhas e bactérias coram-se de vermelho ou púrpura-escuro. As outras partículas, como leveduras e fungos, geralmente adquirem um matiz verde, mas freqüentemente ocorrem reações na gradação de cores das partículas ingeridas. O material de fundo usualmente cora-se em verde, contrastando, portanto, com os protozoários. O contraste é mais evidente do que o obtido com a coloração pela hematoxilina férrica, o qual tende a corar o material em verde-cinza.

8. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

9. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle".

10. *Slides*, fotografias e livros de referência devem estar à disposição no laboratório de Parasitologia[8,10,14].

OUTROS MÉTODOS DE COLORAÇÃO

Coloração pela Tionina

A coloração pela tionina é um procedimento que oferece bons resultados na coloração de trofozoítos e cistos de amebas. O corante é de fácil preparação, prático e seguro.

Amostra

Material fecal preservado pelo acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF) ou pelo fenol-álcool etílico-formaldeído (PAF).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Reagentes

1. Tionina, forma cristalina (CI 52000) ($C_{12}H_9N_3S.C_2H_4O_2$)
2. Fixador acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF) (ver p. 21) ou pelo fenol-álcool etílico-formaldeído (PAF) (ver p. 23)

Preparação da Solução

Tionina, forma cristalina	10mg
Água destilada-deionizada	100ml

• Dissolver a tionina em água. Filtrar e estocar na geladeira em frasco de vidro com tampa esmerilhada.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas em todas as etapas da coloração.
2. Colocar uma gota do corante tionina em uma lâmina de microscopia.
3. Remover uma pequena porção de fezes do recipiente e emulsificar no corante.
4. Deixar alguns minutos em repouso e cobrir a preparação com uma lamínula.
5. Montar com resina sintética (*Cytoseal* 60).

Características da Coloração

As amebas coradas apresentam cor violácea. Nos cistos corretamente corados, o citoplasma exibe uma coloração violáceo-clara e a cromatina nuclear é evidenciada por uma coloração mais acentuada. Nos trofozoítos, as inclusões citoplasmáticas, bactérias e hemácias, coram-se em róseo, enquanto os detritos e as bactérias, oriundas das formas não-invasivas, em violáceo intenso. O citoplasma apresenta-se diferenciado em ectoplasma, corando-se em violáceo-claro e o endoplasma, finamente granuloso, com vacúolos, núcelo e restos de substâncias alimentares, em violáceo-escuro. O núcleo realmente fixado e bem corado toma a cor purpúrea, observando-se a distribuição uniforme dos grãos de cromatina na periferia da membrana nuclear[3].

Solução de Fenol de Kohn

A solução de fenol de Kohn[11] é mais um procedimento de evidenciação do que de coloração, pois as estruturas nucleares são acentuadas sem apresentarem uma diferenciação de cor[5,6].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas).

Reagentes

1. Fenol (C_6H_6O)
2. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)

Preparação

1. Solução I

Fenol (fundido a 44°C)	1ml
Ácido acético glacial	0,6ml
Água destilada-deionizada	50ml

2. Solução II

Fenol (fundido a 44°C)	0,9ml
Água destilada-deionizada	50,0ml

Coloração da amostra

1. Usar luvas em todas as etapas da coloração.
2. Emulsificar uma pequena quantidade de fezes com uma ou duas gotas da Solução I e da Solução II em uma lâmina de microscopia.
3. Cobrir com uma lamínula e examinar.

Observações

1. A Solução I é indicada para a coloração de cistos, e a Solução II, para trofozoítos.
2. Burrows[5] recomenda o uso da Solução II para a coloração das formas císticas e trofozoíticas.
3. O ácido acético glacial da Solução I coagula o citoplasma dos cistos e o núcleo não é salientado tão bem como com a Solução II.

Coloração pelo Corante *Chlorazol Black* E

A coloração permanente pelo *Chlorazol black* E, desenvolvida por Kohn[12], é um procedimento simples que permite obter em uma única solução a preservação e a coloração do material fecal. Esse fixador-corante é usado para

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

espécimes frescos, não sendo recomendado para material fecal preservado pelo fixador APV, porque na coloração não está incluída a etapa do álcool-iodado que remove o cloreto de mercúrio II, um dos componentes encontrados no líquido de Schaudinn e no fixador APV. Os esfregaços devem ser lavados com a solução de álcool etílico a 70% iodado para remover o $HgCl_2$, caso contrário o reagente interfere com a coloração e subseqüente exame microscópico. A diluição ótima e o tempo de coloração devem ser determinados para cada bateria do fixador-corante. O corante modificado[16] é usado para a coloração de protozoários em amostras fecais ou em tecidos. A solução-estoque apresenta conservação indefinida, enquanto a validade da solução de trabalho depende do número de esfregaços fixados e corados em um período de 30 dias. Aproximadamente 20 esfregaços são corados satisfatoriamente em 50ml de corante na cuba de *Coplin*. Quando os esfregaços exibem cor vermelha, a solução deve ser trocada. Entretanto, esse fixador-corante não é usado com freqüência na rotina, por existirem outras opções de fixação e coloração.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas).

Reagentes

1. *Chlorazol black* E (pó) (CI 30235) ($C_{34}H_{25}N_9O_7S_2Na_2$)
2. Álcool etílico (C_2H_6O)
3. Solução de álcool etílico a 95% (v/v)
4. Álcool metílico (CH_4O)
5. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
6. Ácido fosfotúngstico ($24WO_3.2H_3PO_4.48H_2O$)
7. Fenol, fundido a 44°C (C_6H_6O)
8. Xilol (C_8H_{10})
9. Carbol-xilol (fenol-xileno) (ver p. 90)
10. Resina sintética (*Cytoseal* 60)

Preparação das Soluções

1. Solução Básica

Solução de álcool etílico a 90% (v/v)	170ml
Álcool metílico	160ml
Ácido acético glacial	20ml
Fenol, fundido a 44°C	20ml
Solução aquosa de ácido fosfotúngstico a 1% (m/v)	12ml
Água destilada-deionizada	618ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Solução Estoque do Corante

Chlorazol black E (pó)	5g
Solução básica	1.000ml

Preparação do Corante

Adicionar, em um almofariz, 5g do corante a 100ml de solução básica e deixar em repouso por cinco minutos. Lentamente, sob agitação contínua, adicionar todo o volume da solução básica. Estocar em frasco com tampa esmerilhada. Deixar "amadurecer" durante quatro a seis semanas. Um precipitado preto se formará após alguns dias. O líquido sobrenadante, o fixador-corante, apresenta cor cereja-preta. Filtrar o corante em papel-filtro (Whatman n.° 12). Estocar em frasco de cor âmbar com tampa esmerilhada, ao abrigo da luz, da umidade e da poeira.

1. Determinação da Diluição Ótima e do Tempo de Coloração

A diluição ótima e o tempo de coloração devem ser determinados para cada bateria do fixador-corante. As séries de diluições e os períodos de coloração apresentados abaixo são recomendados para esse propósito.

Solução Corante	*Solução Básica*	*Horas*
Não diluída	0	2 a 3
1	1	2 a 4 ou por toda a noite
2	1	2 a 4
1	2	2 ou por toda a noite
1	3	4 ou por toda a noite

A coloração por toda a noite produz excelentes resultados; entretanto, os esfregaços deixados em contato com a solução corante por vários dias resulta em uma supracoloração. Na triagem os esfregaços deverão ser corados com cada diluição, de acordo com o método descrito abaixo, observando-se a diluição ótima e o tempo selecionado para a rotina de coloração com a bateria de corante. A escolha do uso da combinação satisfatória de diluição e do tempo depende da rotina e da urgência do diagnóstico. A média da diluição mais comumente usada é 1:2, por duas horas ou por toda a noite; entretanto, para melhores resultados deverá ser determinada a combinação exata.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas em todas as etapas da coloração.
2. Diluição fixador-corante, duas horas ou por toda a noite (usar na rotina diluição e tempo predeterminado).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

3. Solução de álcool etílico a 95%, 10 a 15 segundos
   ou
4. Álcool etílico a 100%, cinco minutos.
5. Xilol, cinco minutos.
6. Montagem com resina sintética (*Cytoseal* 60).

Características da Coloração

Os trofozoítos dos protozoários corados apresentam cor verde ou verde-acinzentada; os organismos nas fezes velhas coram-se do cinza ao preto. Os núcleos, corpos cromatóides, cariossoma e a membrana celular exibem cor verde-escura à preta. As hemácias no citoplasma coram-se do rosa ao preto. As formas císticas da *E. coli* mostram a cor rosa ou verde e raramente os cistos da *E. histolytica* apresentam-se corados em rosa-pálido[12].

Coloração pelo Corante *Polychrome* IV

O corante *Polychrome* IV é uma combinação da fixação e da coloração, podendo substituir o corante tricrômico na coloração de esfregaços fecais preservados por mertiolato-iodo-formaldeído (MIF), fixador álcool polivinílico (fixador APV) ou acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF). O corante e o procedimento de coloração não foram ainda divulgados, sendo comercializados pela Devetc Inc., P.O. Box 10275, Bradenton FL 34282 e Scientific Device Laboratory Inc., P.O. Box 88, Glenview, IL, 60025, USA. O corante *Polychrome* IV é usado principalmente na coloração de esfregaços permanentes de material fecal preservado pelo MIF[17].

REVISÃO: ESFREGAÇOS PERMANENTES CORADOS

Princípio: Produzir contraste de coloração entre os artefatos do fundo da preparação e os parasitos presentes; permitir o exame e o reconhecimento dos detalhes morfológicos do organismo através do exame com objetiva de imersão (100X), totalizando um aumento de 1.000X. Indicado para identificar e diagnosticar protozoários intestinais.

Amostra: Amostras fecais frescas ou preservadas pelo formaldeído, fixador APV, SAF ou MIF.

Reagentes: Colorações pelo tricrômico, hematoxilina férrica, hematoxilina férrica modificada, *Polychrome* IV ou *Chlorazol* preto E e suas soluções associadas; soluções desidratantes (alcoóis e xilol); e resinas sintéticas ou Bálsamo do Canadá.

Exame: Examinar no mínimo 300 campos com objetiva de imersão; um número adicional de campos poderá ser requerido se um organismo suspeito foi identificado pelo exame direto a fresco ou no sedimento concentrado.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Resultado: A maioria dos protozoários suspeitos e/ou as células humanas são identificados e confirmados através do exame de esfregaços permanentes corados. Esse resultado deve ser expresso como final; o exame direto a fresco ou o exame do sedimento concentrado fornecem resultados preliminares.

Observações e Limitações: O tricrômico e a hematoxilina férrica são os corantes mais comumente usados. Ovos e larvas de helmintos não são identificados através dos esfregaços permanentes corados; oocistos de coccídios e esporos de microsporídios requerem métodos específicos de coloração para serem identificados e diagnosticados. Os esfregaços permanentes corados são normalmente examinados através da objetiva de imersão (100X), objetivas de pequeno e de grande aumento não são recomendadas. O propósito principal desse método é a identificação e diagnóstico dos protozoários intestinais (trofozoítos e cistos). Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brooke MM. PVA-fixative-technique in the laboratory confirmation of amebiasis. Triangle, 4:26-35, 1960.
2. Bruckner DA. Microscopic Examination of Fecal Specimens: Iron Hematoxylin Stain (Modified Spencer-Monroe). In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.3.7.1-7.3.7.5, v.2, 1992.
3. Burrows RB. Microscopic Diagnosis of the Parasites of Man. New Haven: Yale University Press, 1965.
4. Diamond LS. A new rapid stain technic for intestinal protozoa using tergitol-hematoxylin. Am J Clin Pathol, 15:68-69, 1945.
5. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3rd ed. Washington (DC): ASM Press, 1997.
6. Gleason NN, Healy GR. Modification and evaluation of Kohn's one-step staining technic for intestinal protozoa in feces or tissue. Am J Clin Pathol, 43:494-496, 1965.
7. Gomori, G. A rapid one-step trichrome stain. Am J Clin Pathol, 20:661-663, 1950.
8. González-Ruiz A, Bendall, RP. Size Matters: The use of the ocular micrometer in diagnostic parasitology. Parasitol Today, 11:83-85, 1995.
9. Heidenhain M. Uber Vanadiumhaematoxylin, Pikroblauschwars und Kongo-korinth. Zischr. f. wiss. Mikr, 25:401-410, 1908.
10. Kaplan RL. Microscopic Examination of Fecal Specimens: Permanent Stained Smear (Trichrome). In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.3.6.1-7.3.6, v.2, 1992.
11. Kohn J. A rapid laboratory method for the diagnosis of intestinal protozoa in faeces. J Trop Med Hyg, 53:212-214, 1950.
12. Kohn J. A one stage permanent staining method for fecal protozoa. Dapim Refuiim Med Quart Israel, 19:160-161, 1960.
13. Lawless DK. A rapid permanent-mount stain technic for the intestinal protozoa. Am J Trop Med Hyg, 2:1137-1138, 1953.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

14. Markell EK, Voge M, John DT. Medical Parasitology. 7th ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Co., 1992.

15. Melvin DM, Brooke MM. Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites. 3rd ed. HHS publication No (CDC) 82-8282. Atlanta:Laboratory Training and Consultation Division, Centers for Disease Control, 1982.

16. Miller JM. Quality control of media, reagents, and stains. In: Ballows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL et al. eds. Manual of Clinical Microbiology. 5th ed. Washington (DC): ASM Press, 1203-1225, 1991.

17. Price DL. Procedure Manual for the Diagnosis of Intestinal Parasites. Boca Raton: CRC Press, 1993.

18. Spencer FM, Monroe LS. The Color Atlas of Intestinal Parasites. Springfield (Ill): Charles C. Thomas, 1968.

19. Tompkins VM, Miller JK. Staining intestinal protozoa with iron-hematoxylin-phosphotungstic acid. Am J Clin Pathol, 17:755-758, 1947.

20. Wheatley W. A rapid staining procedure for intestinal amoebae and flagellates. Am J Clin Pathol, 21:990-991, 1951.

21. Yang J, Scholten T. A fixative for intestinal parasites permitting the use of concentration and permanent staining procedures. Am J Clin Pathol, 67:300-304, 1977.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CAPÍTULO 4



Isolamento e Cultura de Larvas de Nematóides

Geraldo Attilio De Carli

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As larvas de *Strongyloides stercoralis* são usualmente as únicas larvas encontradas nos espécimes fecais. Dependendo dos movimentos de trânsito do intestino e das condições do paciente, larvas rabditóides e, raramente, larvas filarióides poderão estar presentes. Quando houver demora na realização do exame parasitológico das fezes, poderão ser identificados e diagnosticados ovos embrionados e larvas de ancilostomídeos[3].

A cultura das fezes para o isolamento de larvas é útil para: a) revelar a presença de larvas, quando esses organismos estão em pequeno número e não são detectados pelas técnicas de concentração; b) estabelecer se a infecção é devida ao *S. stercoralis* ou aos ancilostomídeos, pelo estudo das características morfológicas fundamentais das larvas rabditóides, e permitir a eclosão dos ovos e a libertação das larvas de primeiro estádio (L1) dos ancilostomídeos, e c) favorecer o desenvolvimento das larvas ao estádio filarióide para uma diferenciação morfológica ulterior[2,3,13].

O uso de certos métodos de cultura-fecal (coprocultura) são indicados para a detecção de infecções discretas dos ancilostomídeos, do *S. stercoralis* e do *Trichostrongylus* spp. como também para a identificação específica dos parasitos. Essas técnicas são utilizadas para a obtenção de um grande número de larvas infectantes para fins de pesquisa.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Método de Baermann-Moraes

O método original de Baermann[4], concebido para a pesquisa de larvas no solo, foi modificado e adaptado por Moraes[12] para a pesquisa desses estádios de evolução nas fezes humanas. Esse procedimento fundamenta-se no termo hidrotropismo positivo das larvas de nematóides.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas). Fezes armazenadas sob refrigeração não devem ser utilizadas.

Aparelho

O aparelho é constituído de funil de vidro ou de plástico de 10 a 12cm de diâmetro, tendo a haste ligada a um tubo de borracha (5 a 10cm de comprimento) fechado com uma pinça de Mohr (Fig. 4.1A). O conjunto é colocado em suporte apropriado. Colocar sobre o funil uma tela metálica ou usar um coador de plástico (Fig. 4.1B). Um pedaço de gaze dobrada duas vezes é colocado sobre a tela de metal (Fig. 4.1C). A gaze pode ser substituída pelo filtro descartável com alça de segurança (Parasitofiltro®).

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.
2. Encher o funil com água corrente, aquecida a 40-45°C.
3. Abrir a pinça de Mohr, deixando escorrer uma pequena quantidade de água para evitar a formação de bolhas de ar na haste e no tubo de borracha.

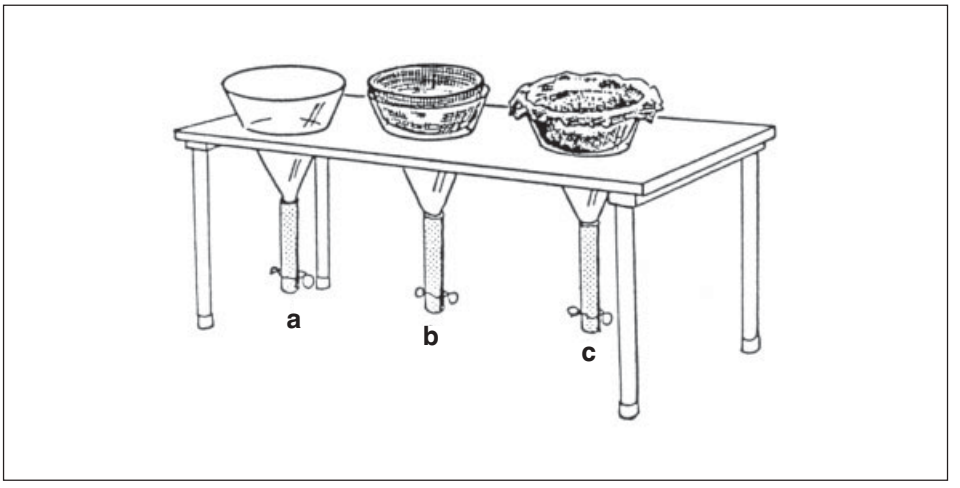


Fig. 4.1 — *Aparelho de Baermann: (a) Funil e tubo de borracha com pinça de Mohr; (b) Funil com peneira de arame; (c) Gaze contendo fezes. (Segundo Pessôa SB, Martins AV. Pessôa. Parasitologia Médica. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

4. Colocar 8 a 10g de fezes, recentemente emitidas, sobre gaze dobrada duas vezes e, se necessário, juntar mais água, até que as fezes fiquem submersas. A gaze pode ser substituída pelo filtro descartável com alça de segurança (Parasitofiltro®).

5. Deixar em repouso durante 120 minutos.

6. Abrir a pinça e coletar parte do líquido em vidro de relógio; examinar ao microscópio estereoscópio (aumentos 20 a 30X). Deixar em repouso durante alguns minutos, pois, desta forma, as larvas migrarão para o centro do vidro de relógio, ou proceder de acordo com o item 7.

7. Coletar em tubo cônico de centrífuga. Centrifugar (500 x *g*/1min) e examinar o sedimento entre lâmina e lamínula. Corar a preparação com solução de iodo de Lugol para a identificação das características morfológicas das larvas e examinar ao microscópio com aumento de 20X[14].

Observações

1. Este método é indicado para a pesquisa de larvas de *S. stercoralis* e de ancilostomídeos. As amostras líquidas submetidas ao método de Baermann-Moraes[4,12] deverão ser misturadas com pedaços de lenço de papel ou papel higiênico ou com farinha de milho[6].

2. Freqüentemente a observação das características morfológicas é dificultada pelo movimento das larvas. Para matar as larvas e estudar esses organismos, aquecer levemente ou adicionar uma gota de solução de iodo de Lugol ou de formaldeído a 10% à suspensão colhida.

3. Esse método permite o isolamento de larvas parasitas e de vida livre de nematóides. Quando o material fecal foi contaminado com terra ou água contendo larvas de vida livre, a diferenciação entre esses organismos é realizada pela resistência que as larvas parasitas apresentam às soluções levemente ácidas (adicionar 0,3ml de ácido clorídrico concentrado para cada 10ml de água contendo as larvas. Ajustar o volume para obter uma diluição final de 1:30 de ácido). As larvas de vida livre dos nematóides são mortas nesta solução ácida, enquanto os espécimes parasitos permanecem vivos durante 24 horas[17].

4. Todo cuidado é necessário durante o transporte do líquido para prevenir infecção. Fezes preservadas ou amostras obtidas após a administração de bário não devem ser usadas neste método. Fezes armazenadas sob refrigeração não deverão ser usadas. Larvas de certas espécies são sensíveis ao frio.

Método de Rugai, Mattos e Brisola

Esse método fundamenta-se no termo hidrotropismo positivo das larvas de nematóides[16].

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas). Fezes armazenadas sob refrigeração não deverão ser utilizadas.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Estender, sobre a abertura de um recipiente contendo fezes, gaze dobrada duas vezes, e repuxar as extremidades para trás (Fig. 4.2).

3. Encher, com aproximadamente 70 a 100ml de água corrente aquecida a 40-45°C, um copo cônico de sedimentação (capacidade 125ml).

4. Transferir o recipiente com as fezes para o interior do copo cônico de sedimentação, de modo que o líquido alcance toda a extensão da abertura do recipiente, cuidando para não formar bolhas de ar.

5. Deixar em repouso durante 120 minutos.

6. Colher o sedimento, no fundo do copo cônico, com pipeta capilar longa. Alguns autores recomendam retirar o recipiente do copo cônico antes da colheita do sedimento. Entretanto, outros preferem manter o recipiente para evitar o revolvimento do líquido.

7. Examinar o sedimento entre lâmina e lamínula. Corar a preparação com solução de iodo de Lugol[15].

Observações

1. Esse método é indicado para a pesquisa de larvas de *S. stercoralis*.

2. Freqüentemente a observação das características morfológicas é dificultada pelo movimento das larvas.

3. Aquecer levemente ou adicionar uma gota de solução de iodo de Lugol ou de formaldeído à suspensão colhida para matar as larvas e estudar esses organismos.

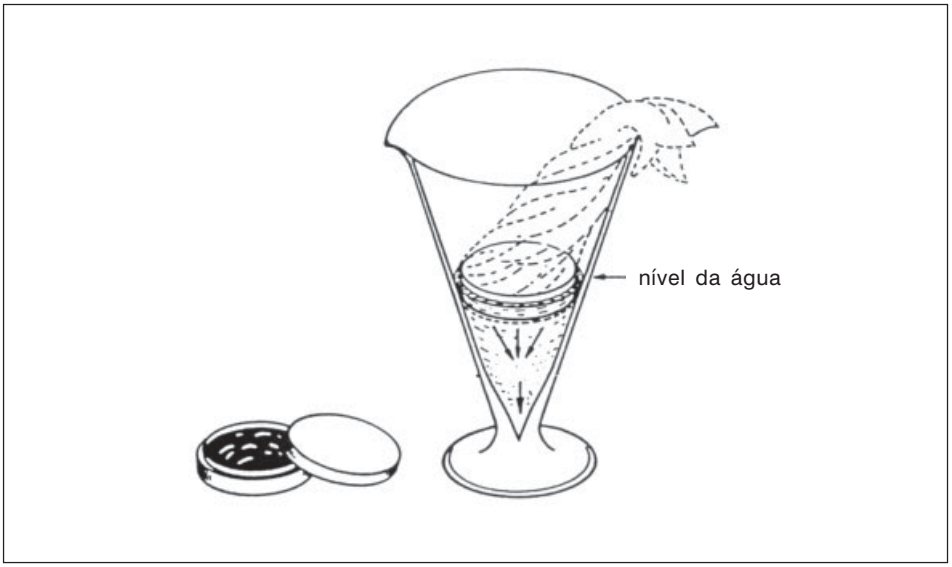


Fig. 4.2 — *Método de Rugai, Mattos e Brisola para a extração de larvas de* Strongyloides stercoralis *(Segundo Rey L. Parasitologia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991).*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Cultura no Papel-filtro em Tubo de Ensaio

O método de Harada e Mori[7] baseia-se na identificação microscópica de larvas de nematóides que emergem de amostras fecais cultivadas no papel-filtro em tubo de ensaio. Sasa e cols.[17] e Hsieh[8] modificaram o procedimento, objetivando facilitar o exame de grande número de amostras em inquéritos epidemiológicos de ancilostomídeos e de parasitos relacionados com o homem e com os animais domésticos. O procedimento é especialmente útil no diagnóstico de infecções humanas pelo *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *S. stercoralis* e *Trichostrongylus orientalis*[11,14,21].

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas). Fezes armazenadas sob refrigeração não deverão ser utilizadas.

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Preparar uma fita de papel-filtro de 15 x 1cm ou 15 x 2cm, com uma dobradura no meio.

3. Espalhar 0,5g de fezes frescas no papel-filtro, formando um esfregaço fecal fino e uniforme, em um dos lados da fita, exceto nas áreas de 4cm distante de ambas as extremidades. Um esfregaço fecal espesso na fita pode resultar em decréscimo na média de eclosão.

4. Introduzir a fita de papel-filtro em tubo de ensaio de 18 x 180mm ou 20 x 200mm (Fig. 4.3), ou em um tubo cônico de centrífuga de 17 x 120mm de maneira que a água não contate as fezes (Fig. 4.4).

5. Fechar o tubo com rolha de borracha, conservando-o na posição vertical durante 10 a 14 dias, à temperatura de 25-30°C. Papel de celofane ou de polietileno, fixado por meio de um anel de borracha, pode substituir a rolha de borracha, para prevenir a dessecação.

6. No fim do período de incubação, colher, com longa pipeta capilar, a água do fundo do tubo, a fim de observar se existem larvas filarióides ou examinar em microscópio invertido.

7. Em caso positivo, retirar a rolha e, em seguida, o papel-filtro.

8. Colocar o tubo em banho de água a 50°C durante 15min (para matar as larvas) e transferir a água para um tubo de centrifugação de 15ml e centrifugar (500 x *g* por um minuto). Decantar e colocar as larvas em uma lâmina e examinar com pequeno aumento.

Observações

1. Os ovos de *Necator americanus* nas fezes morrem após 24 horas, quando as fezes são armazenadas a 0°C. Por essa razão, os espécimes fecais

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

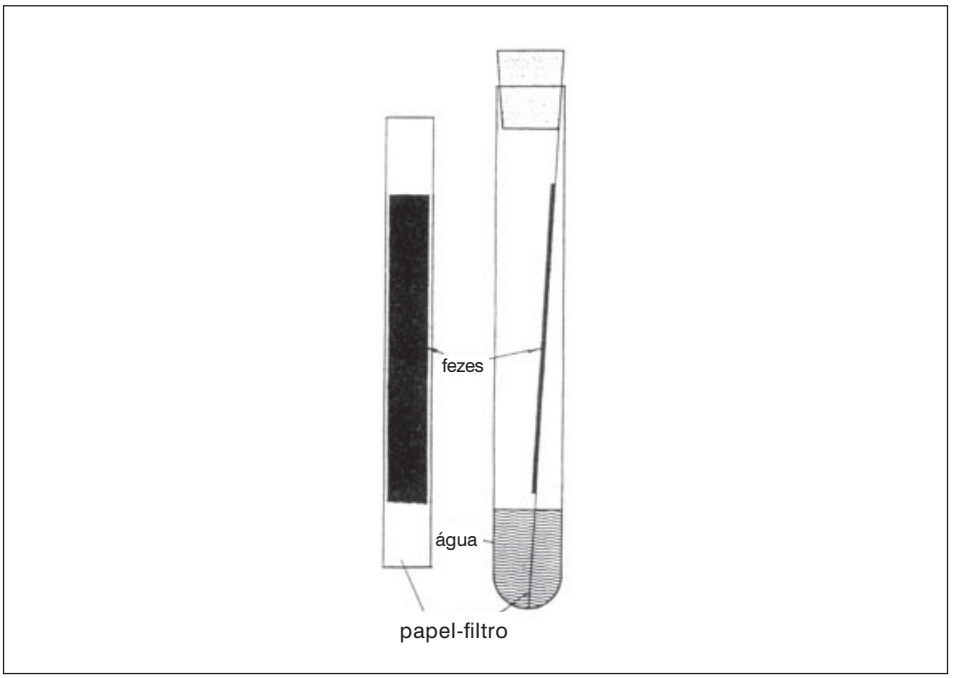


Fig. 4.3 — *Método de Harada e Mori para a cultura de larvas de nematóides nas fezes (em tubo de ensaio). (Adaptada de Pessôa SB, Martins AV. Pessôa. Parasitologia Médica. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.)*

que serão examinados por esse método devem ser mantidos, até o momento do exame, à temperatura de 10-25°C, sob condições ótimas de umidade.

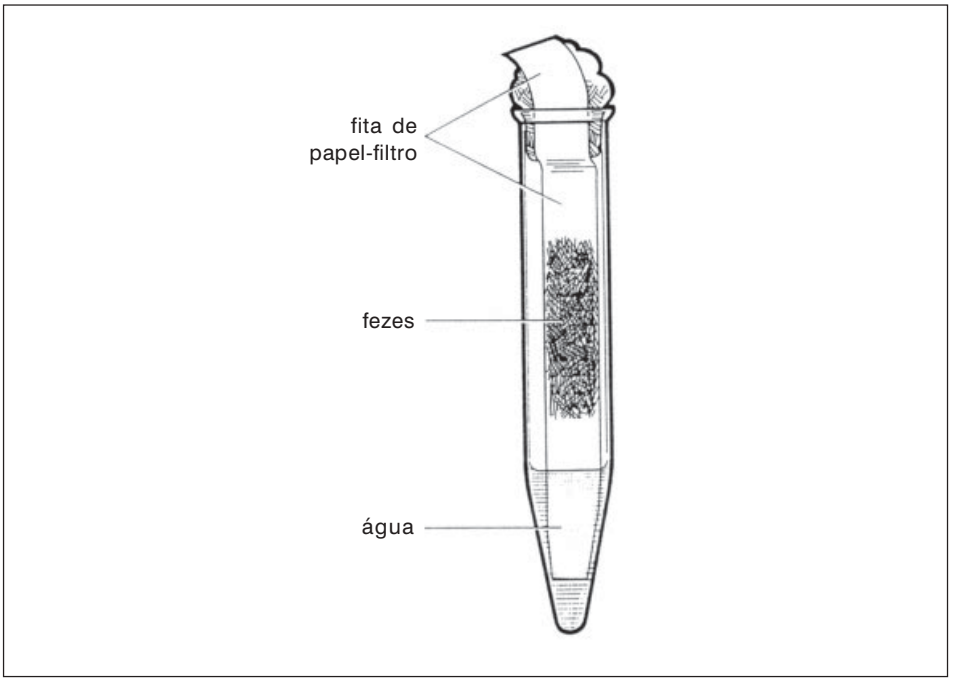


Fig. 4.4 — *Método de Harada e Mori para a cultura de larvas de nematóides nas fezes (em tubo de centrífuga). (Segundo Melvin DM, Brooke MM. Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites. 3rd ed. USDHHS PHS (CDC), 82-8282, 1982.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Durante o inverno a média de isolamento de larvas é menor do que nas outras estações. A dessecação resulta na deterioração das culturas. Se o esfregaço ficar imerso na água, mesmo parcialmente, as bactérias e leveduras proliferarão no substrato, havendo uma conseqüente deficiência do oxigênio dissolvido; as larvas emergentes são mortas e a detecção torna-se impossível.

3. Quando pequenas quantidades de água são usadas, poucas larvas emergem, devido à dessecação e o uso de grande quantidade de água favorece a contaminação, devido ao contato com as fezes. O volume ótimo é de 4 a 5ml. A temperatura ideal da cultura varia entre 25-30°C. Os melhores resultados foram obtidos a 28°C.

4. Geralmente as larvas emergem na água ao redor do terceiro dia.

5. Freqüentemente a observação das características morfológicas é dificultada pelo movimento das larvas. Para matar as larvas e estudar esses organismos, aquecer levemente ou adicionar uma gota de solução de iodo de Lugol ou de formaldeído à suspensão colhida. Esse método permite o isolamento de larvas de nematóides parasitos e de vida livre.

6. Quando o material fecal foi contaminado com terra ou água contendo larvas de vida livre, a diferenciação entre esses organismos é realizada pela resistência que as larvas parasitas apresentam às soluções levemente ácidas (adicionar 0,3ml de ácido clorídrico concentrado para cada 10ml de água contendo as larvas, ajustar o volume para obter uma diluição final de 1:30 de ácido.) As larvas de vida livre dos nematóides são mortas nesta solução ácida, enquanto as espécies parasitas permanecem vivas durante 24 horas[19].

7. Todo cuidado é necessário para prevenir infecção durante o transporte do líquido e da tira de papel-filtro, uma vez que as larvas infectantes podem migrar na tira de papel-filtro, para cima ou para baixo.

Cultura no Papel-filtro em Placa de Petri

Esse método alternativo de cultura, para o isolamento de larvas de nematóides, foi originalmente descrito por Little[10]. Como nos métodos previamente descritos, a umidade necessária é fornecida pelo papel-filtro embebido em água. Este método apresenta a vantagem de permitir ao parasitologista a observação das larvas de nematóides e estádios de vida livre de *S. stercoralis* na massa fecal ou na água, pelo exame direto com microscópio invertido, sem a preparação prévia de uma lâmina.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas). Fezes armazenadas sob refrigeração não deverão ser utilizadas.

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Preparar uma fita de papel-filtro de 25 x 73mm.

3. Espalhar 1 a 2g de fezes frescas no centro da fita de papel-filtro.

4. Colocar a fita sobre uma lâmina de vidro para microscopia (25 x 73mm). Deixar a lâmina na posição inclinada, aproximadamente 10°, em um lado da placa de Petri ou em um pequeno cristalizador, apoiada em bastão de vidro ou em tubo de vidro.

5. Adicionar água destilada-deionizada ou fervida, de maneira que um quarto da lâmina esteja mergulhado na água. Fechar a placa de Petri, deixando à temperatura ambiente (24 a 28°C) e adicionar água, quando necessário, para manter o nível original (Fig. 4.5).

6. Conservar a lâmina na posição inclinada durante 10 dias. Examinar, diariamente, pelo microscópio invertido ou colher, com pipeta capilar, a água do fundo da placa, a fim de observar se existem larvas filarióides.

7. No fim do período de incubação, preparar um esfregaço e uma lâmina e examinar com pequeno aumento.

8. Estudar as características morfológicas de cada larva isolada.

Observações

1. Freqüentemente, a observação das características morfológicas é dificultada pelo movimento das larvas. Para matar as larvas e estudar esses organismos, aquecer levemente ou adicionar uma gota de solução de iodo de Lugol ou de formaldeído à suspensão colhida. Essa técnica permite o isolamento de larvas de nematóides parasitos e de vida livre.

2. Quando o material fecal for contaminado com terra ou água contendo larvas de vida livre, a diferenciação entre esses organismos é realiza-

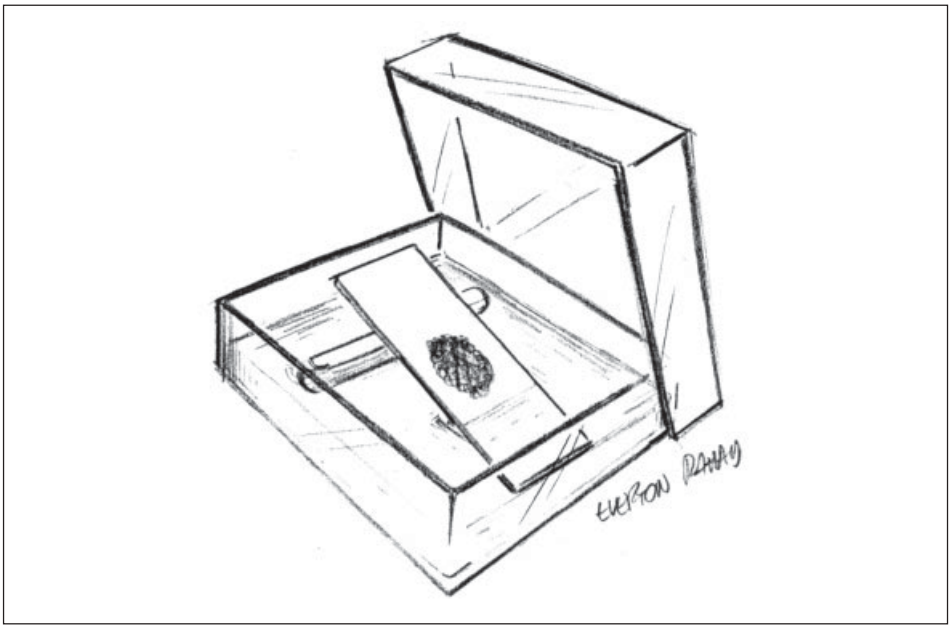


Fig. 4.5 — *Método de cultura no papel-filtro, em um pequeno cristalizador, para a identificação de larvas de nematóides.*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

da pela resistência que as larvas parasitas apresentam às soluções levemente ácidas (adicionar 0,3ml de ácido clorídrico concentrado para cada 10ml de água contendo as larvas e ajustar o volume para obter uma diluição final de 1:30 de ácido). As larvas de vida livre dos nematóides são mortas nesta solução ácida, enquanto as espécies parasitas permanecem vivas durante 24 horas[20].

3. As larvas infectantes podem ser encontradas a qualquer momento depois do quarto dia de incubação. Todo o cuidado é necessário para prevenir infecção durante o transporte do líquido e da tira de papel-fitro já que as larvas infectantes podem migrar na tira de papel-filtro, para cima ou para baixo.

Cultura de Larvas em Carvão

O método de cultura de larvas em carvão é um procedimento indicado para o isolamento de larvas infectantes de ancilostomídeos, *S. stercoralis* e *Trichostrongylus*. A mistura do material fecal e o carvão granulado é semelhante às condições encontradas no solo na natureza.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas). Fezes armazenadas sob refrigeração não devem ser utilizadas.

Reagentes

1. Carvão granulado n.º 40
2. Nistatina

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Misturar 20 a 40g de fezes com água destilada até que se produza uma suspensão fecal espessa.

3. Transferir a suspensão fecal para uma placa para cristalização (100 x 50mm) (Pyrex n.º 3.140) e completar até a metade com carvão granulado vegetal.

4. Misturar a suspensão, com abaixador de língua de madeira, até que a mesma fique uniformemente misturada com o carvão granulado, agora úmido. Adicionar quantidade suficiente de água para produzir umidade adequada. Evitar a formação de camada de água no fundo da placa de cristalização. A superfície da cultura deve brilhar quando a umidade estiver na quantidade exata.

5. Fechar a cuba, deixando-a no escuro, à temperatura ambiente (25 a 28°C) por cinco a seis dias.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

6. Supervisionar diariamente a cultura para controlar a umidade. Se a superfície não estiver brilhante, aspergir a superfície com água.

7. Para concentrar as larvas infectantes, preparar um chumaço de gaze com 10 a 12 camadas, com o mesmo diâmetro da cuba de cristalização. Molhar levemente o chumaço de gaze com água destilada (não deixar a água gotejar), colocando-o, com o auxílio de pinças, sobre a superfície do carvão. Não tocar as mãos ou os dedos na superfície do carvão na placa de cristalização.

8. Expor a placa coberta à luz (lâmpada de 75 watts), posicionada aproximadamente 15 a 20cm acima da tampa de gaze da placa com a cultura.

9. Depois de 30 minutos, remover com todo cuidado a tampa-chumaço de gaze com duas pinças.

10. Transferir o chumaço de gaze para o interior do copo cônico de sedimentação, de modo que a água, previamente colocada no copo cônico, cubra toda a gaze.

11. Deixar em repouso durante 60 minutos.

12. Colher o sedimento, no fundo do copo cônico, com pipeta capilar longa.

13. Examinar o sedimento entre lâmina e lamínula. Corar a preparação com solução de Lugol.

Observações

1. As fezes de certos animais podem conter fungos. Por essa razão, é aconselhável adicionar pequena quantidade de nistatina diluída à suspensão fecal para evitar o crescimento demasiado desses organismos, o que viria a ser nocivo para as larvas.

2. Aproximadamente cinco a seis dias depois que a cultura foi preparada, larvas de ancilostomídeos e de *Strongyloides* adquirem o estádio infectante. Transferir com todo o cuidado o chumaço de gaze, porque as larvas de *S. stercoralis* freqüentemente migram para a superfície do chumaço onde se encontram as gotas condensadas. Essas gotas podem estar cheias de larvas.

Cultura de Larvas de *Strongyloides stercoralis* em Placa de Ágar

A cultura em ágar, método de Arakaki e Koga[1], para o isolamento de larvas de *Strongyloides stercoralis*, é um excelente procedimento para o diagnóstico da estrongiloidíase. Esse procedimento é mais sensível do que os outros métodos de diagnóstico. As fezes são colocadas em placas de Petri, seladas para prevenir uma infecção acidental e deixadas por dois dias à temperatura ambiente. As larvas movem-se lentamente sobre o ágar, arrastando as bactérias, criando uma visível trilha na superfície do ágar. As placas são examinadas ao microscópio para confirmação da presença dos organismos, depois a superfície do ágar é lavada com formalina a 10%. A confirmação final da identificação das larvas é realizada pelo exame direto do sedimento concentrado lavado[3,9].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas) e/ou conteúdo duodenal fresco. Os espécimes armazenados sob refrigeração não devem ser utilizados.

Reagentes

1. Ágar (Difco)
2. Extrato de carne (Difco)
3. Peptona (Difco)
4. Cloreto de sódio (NaCl)
5. Formaldeído a 10% (ver p. 9)

Meio de Cultura

Ágar	15g
Extrato de carne	0,5g
Peptona	1g
Cloreto de sódio	0,5g
Água destilada-deionizada	100ml

• Dissolver os ingredientes em 100ml de água e distribuir em placas de Petri estéreis descartáveis, 95 x 15mm, na razão de 20ml por placa.

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Repicar aproximadamente 2g de fezes ou de conteúdo duodenal em placa de ágar em uma superfície de aproximadamente 1cm de diâmetro.

3. Tampar e lacrar as placas de ágar com fita de celofane adesiva e transparente para prevenir uma acidental infecção.

4. Deixar as placas de ágar durante dois dias à temperatura ambiente (24 a 28°C) ou incubar à temperatura de 26 a 33°C por dois dias.

5. Examinar as placas de ágar depois de dois dias de incubação, através da tampa, no microscópio invertido, para confirmar a presença das larvas na superfície do ágar. (As larvas movimentam-se sobre o ágar, carregando as bactérias e criando verdadeiras trilhas sobre o substrato sólido.)

6. Furar a tampa da placa. Lavar a superfície do ágar pela adição, através do orifício, de 10ml de solução de formaldeído a 10%. Deixar em repouso durante 30 minutos.

7. Remover a fita de celofane adesiva e transparente e a tampa da placa de ágar. Transferir todo o volume da suspensão de formalina a 10% para

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

um tubo cônico de centrífuga de 15ml com o auxílio de um funil (evitar que o líquido escorra para fora do tubo e contamine a centrífuga).

8. Centrifugar (500 x *g*/5min) o lavado formolizado colhido da superfície do ágar.

9. Examinar o sedimento concentrado entre lâmina e lamínula para a presença de larvas rabditóides e/ou filarióides (aumento 400X).

10. Corar a preparação com solução de iodo de Lugol. Esse procedimento é muito sensível, devendo ser extensivamente usado.

Observações

1. Quando as larvas são de difícil observação através do exame microscópico, como também as características morfológicas, matar as larvas dentro da placa de Petri com solução de formalina a 10% e examinar o sedimento formolizado concentrado. As larvas infectantes podem ser encontradas depois do primeiro ou segundo dia de incubação ou após o primeiro dia nas infecções maciças.

2. Quando as larvas infectantes estiverem presentes no ágar, todas as placas devem ser transportadas com cuidado, uma vez que a fita de celofane adesiva e transparente pode ser removida.

3. As placas de Petri não devem ser invertidas, elas devem ser mantidas na sua posição normal, com a tampa para cima. Para a realização desse procedimento as fezes devem ser frescas.

4. Não usar amostras fecais preservadas ou espécimes obtidos após a administração do contraste sulfato de bário. Essa técnica é bem-sucedida, mesmo quando algumas larvas estiverem presentes no espécime fecal. As larvas não sobrevivem nas fezes frescas muito velhas.

Controle de Qualidade: Isolamento e Cultura de Larvas de Nematóides (Métodos de Baermann e Moraes; Rugai, Mattos e Brisola; Harada e Mori; Arakaki-Koga e Little)

1. Para obter excelentes resultados com os métodos, seguir os procedimentos de colheita e de transporte dos espécimes fecais para o exame parasitológico.

2. Examinar, quando possível, amostras positivas e negativas de fezes (de animais de laboratório) para ter certeza de que o procedimento utilizado é preciso.

3. Rever diagramas de larvas para confirmar a identificação.

4. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

5. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[18-20].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

REVISÃO: CULTURA DE LARVAS DE NEMATÓIDES

Princípio: A cultura das fezes para o isolamento de larvas é útil para: a) revelar a presença de larvas, quando esses organismos estão em pequeno número e não são detectados pelas técnicas de concentração; b) estabelecer se a infecção é devida ao *S. stercoralis* ou aos ancilostomídeos, por meio do estudo das características morfológicas fundamentais das larvas rabditóides e permitir a eclosão dos ovos e a libertação das larvas de primeiro estádio (L1) dos ancilostomídeos, e c) favorecer o desenvolvimento das larvas ao estádio filarióide para uma diferenciação morfológica ulterior.

Espécimes: Amostras fecais frescas. Fezes armazenadas sob refrigeração não devem ser utilizadas.

Exame: Observar diariamente o líquido de cultura para a presença de larvas e manter as culturas por 10 dias antes de relatar o resultado final.

Resultados: O insucesso para isolar larvas não descarta a possibilidade de infecção; entretanto, a probabilidade de infecção é provavelmente menor quando os resultados são negativos.

Observações e Limitações: Usar luvas durante todas as etapas do procedimento, todo o cuidado é necessário para prevenir infecção durante o transporte do líquido da cultura para exame. Manter o sistema de cultura hidratado; principalmente durante os dois primeiros dias, quando uma certa quantidade de água evapora e a dessecação resulta na deterioração das culturas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arakaki T, Iwaanaga M, Kinjo F et al. Efficacy of agar-plate culture in detection of *Strongyloides stercoralis* infection. J Parasitol, 76:425, 1990.
2. Ash LR, Oriehl TC. Parasites: a Guide to Laboratory Procedures and Identification. Chicago (Ill): ASCP Press, 1991.
3. Ash LR, Oriehl TC. Atlas of Human Parasitology. 4th ed. Chicago (Ill): ASCP Press, 1997.
4. Baermann G. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden). In: Larven in Erdproben. Neded Geneesk Laborat Weltever Feestbundel. 41, 1917.
5. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3th ed. Washington (DC): ASM Press, 1997.
6. Goulart EG. Parasitologia e Micologia Humana. Auto-Avaliação. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica Ltda., 1983.
7. Harada U, Mori OA. A new method for culturing hookworm. Yonago Acta Med, 1:177-179, 1955.
8. Hsieh HC. A test-tube filter-paper method for the diagnosis of *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, and *Strongyloides stercoralis*. WHO Tech Rep Ser, 255:27-30, 1962.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

9. Koga K, Kasuya S, Khamboonruang C et al. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. Am J Trop Med Hyg, 45:518, 1991.

10. Little MD. Comparative morphology of six species of *Strongyloides* (Nematoda) and redefinition of the genus. J Parasitol, 52:69-84, 1966.

11. Melvin DM, Brooke MM. Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites. 3rd ed. HHS publication No (CDC) 82-8282. Atlanta: Laboratory Training and Consultation Division, Centers for Disease Control, 1982.

12. Moraes RG. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrongiloidíase no Brasil. Rev Serv Saúde Pública (RJ), 1:507-24, 1948.

13. Neto Amato V, Campos R. Diagnóstico das Parasitoses Intestinais pelo Exame das Fezes. São Paulo: Livraria Editora Artes Médicas Ltda., 1968.

14. Pessôa SB, Martins AV. Pessôa. Parasitologia Médica. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

15. Rey L. Parasitologia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

16. Rugai E, Mattos T, Brisola AP. Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes-modificação do método de Baermann. Rev Inst A Lutz, 14:5-8, 1954.

17. Sasa M, Hayashi S, Tanaka H, Shirasaka R. Application of test-tube cultivation method on the survey of hookworm and related human nematode infection. Jpn J Exp Med, 28:129-137, 1958.

18. Shawar R. Culture of Larval-Stage Nematodes: Baermann Technique. In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.5.1.1-7.5.1.4, v.2, 1992.

19. Shawar R. Culture of Larval-Stage Nematodes: Harada-Mori Technique. In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.5.2.1-7.5.2.3, v.2, 1992.

20. Shawar R. Culture of Larval-Stage Nematodes: Petri Dish-Filter Paper Slant. In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.5.3.1-7.5.3.3, v.2, 1992.

21. Suzuki N. Diagnostic method in intestinal helminth infections. In: Yokogswa M ed. Collect Papers on the Control of Soil-transmitted Helminthiases. Tokyo: APCO Research Group, 25-33, v.1, 1980.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CAPÍTULO 5



Demonstração e Quantificação de Ovos nas Fezes

Geraldo Attilio De Carli

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os únicos parasitos humanos para os quais é possível correlacionar a produção de ovos com a carga parasitária são *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, ancilostomídeos (*Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*) e *Schistosoma mansoni*. O conhecimento da carga parasitária é útil para determinar a intensidade da infecção, decidir pela medicação e avaliar a eficácia dos medicamentos administrados. Não se deve esquecer que a estimativa da contagem dos ovos varia em relação direta com a acuidade do procedimento. Quando dois ou mais espécimes fecais são comparados, o mesmo microscopista deve excetuar a técnica de todas as amostras e realizar múltiplas contagens. A intensidade de uma infecção é determinada pelo número de ovos encontrados.

Os métodos quantitativos foram desenvolvidos com esse propósito. Ovos por grama (OPG) é o número de ovos por grama de fezes e pode ser definido como um índice de densidade dos ovos nas fezes. Ovos por dia (OPD) são obtidos pela multiplicação do OPG pelo peso total (g) do material fecal de 24 horas. Ovos por dia por fêmea (OPDPF) é o resultado da divisão OPD pelo número de vermes fêmeas albergadas pelo hospedeiro[28].

OPD = OPG x g

OPDPF = OPD ÷ n.º de vermes

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Conhecendo-se o OPG, pode-se calcular o número de vermes e estimar quantitativamente o efeito do controle das parasitoses, como também a eficácia dos anti-helmínticos. Os métodos quantitativos de Stoll[25], Stoll e Hausheer[26], Kato e Miura[16], Beaver[3,4], Bell[5], Barbosa[2], Martin e Beaver[21], Katz, Chaves e Pelegrino[19] e Teesdale e Amin[29] foram introduzidos objetivando estudar a intensidade das infecções.

Método de Stoll e Hausheer

Stoll introduziu o método da contagem de ovos, o qual foi modificado e simplificado por Stoll e Hausheer[26]. A solução de hidróxido de sódio 0,1M saponifica as gorduras, libertando os ovos dos detritos fecais, mantendo a suspensão clara. O frasco é do tipo *Erlenmeyer* e, para facilitar a adição da solução de hidróxido de sódio e do material fecal, dois níveis estão gravados ao longo do gargalo, correspondendo a 56 e 60ml (Fig. 5.1).

Pipetas de Stoll (com bulbo de borracha) graduadas em 0,075 e 0,15ml são usadas para a colheita da suspensão.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas). Não usar fezes preservadas.

Reagentes

Solução de Hidróxido de Sódio 0,1M

Hidróxido de sódio (NaOH)	4g
Água destilada-deionizada q.s.p.	1.000ml

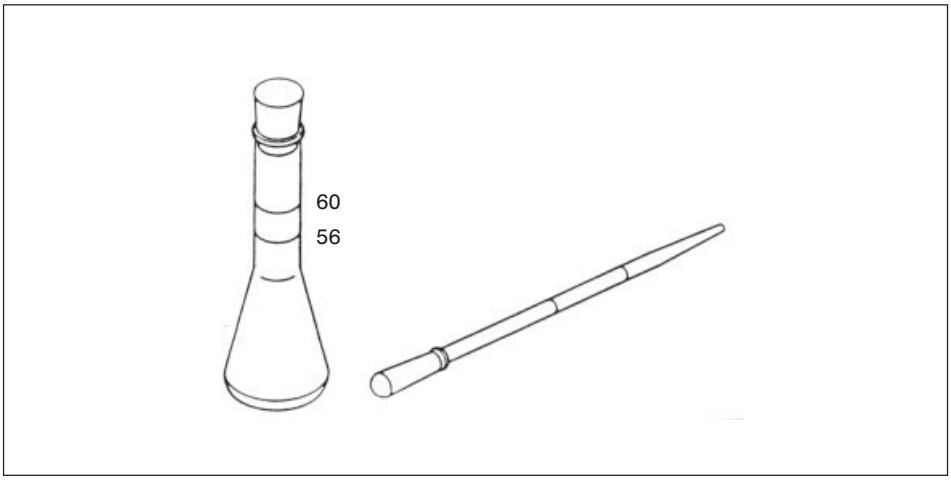


Fig. 5.1 — *Frasco e pipeta de Stoll. (Adaptada de Melvin DM, Brooke MM. Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites. 3rd ed. USDHHS PHS (CDC), 82-8282, 1982.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

• Dissolver o NaOH em pequena quantidade de água em *beaker* de um litro. Completar o volume. Não é necessário padronizar a solução para a contagem de ovos.

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Completar o volume até 56ml do frasco de Stoll com solução de hidróxido de sódio 0,1M, correspondendo ao nível inferior.

3. Adicionar fezes até que o líquido atinja o nível superior, correspondente a 60ml.

4. Introduzir no frasco 10 a 20 esferas de vidro (3 a 4mm de diâmetro) e fechar com rolha de borracha.

5. Agitar vigorosamente o frasco na posição invertida durante um minuto, se as fezes forem sólidas, para obter uma solução homogênea. Deixar em repouso por aproximadamente 12 horas.

6. Colher no centro do frasco, após agitação, 0,075 ou 0,15ml da suspensão.

7. Colocar no centro de uma lâmina de microscopia o conteúdo da pipeta. Cobrir a gota com uma lamínula de 22 x 44mm.

8. Examinar sistematicamente a preparação com objetiva de pequeno aumento. Contar o número de ovos e multiplicar por 100, se a amostra foi de 0,15ml, e por 200, se foi de 0,075ml. O resultado fornecerá o número de ovos/ml ou de ovos/g (OPG).

Observações

1. A estimativa de ovos/grama varia de acordo com a consistência das fezes usadas na preparação.

2. As seguintes correções deverão ser feitas conforme a natureza das fezes: semipastosas multiplicar pelo fator 1,5; pastosas, por 2,0; pastosas-diarréicas, por 3,0; e diarréicas, por 4,0[22,25,28].

3. A contagem de ovos em amostras líquidas, geralmente, não é de confiança. Entretanto, as contagens mais acuradas são realizadas em fezes sólidas ou semipastosas.

4. A contagem deverá ser realizada no mínimo três vezes, devendo ser sempre coletado o mesmo número de amostras da preparação. *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, ancilostomídeos (*Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*) e *Schistosoma mansoni* são os únicos parasitos humanos para os quais é possível correlacionar a produção de ovos com o número de vermes adultos.

5. Em certas situações, é de extrema importância informações referentes à carga parasitária; quando existe, por exemplo, a necessidade de determinar a intensidade da infecção, é preciso decidir sobre uma possível quimioterapia e estimar a eficácia do fármaco administrado[13,21].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Método de Stoll Modificado

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas). Não usar fezes preservadas.

Reagentes

Solução de Hidróxido de Sódio 0,1M

Hidróxido de sódio (NaOH)	4g
Água destilada-deionizada q.s.p.	1.000ml

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Completar o volume até 14ml do tubo de centrífuga de 15ml com solução de hidróxido de sódio 0,1M, correspondendo ao nível inferior.

3. Adicionar fezes até que o nível do líquido atinja o nível superior, correspondendo a 15ml.

4. Fechar o tubo com rolha de borracha.

5. Quando as fezes forem sólidas, para obter uma solução homogênea, agitar vigorosamente o tubo na posição invertida durante um minuto. Deixar em repouso por aproximadamente 12 horas.

6. Colher no centro do tubo, após agitação, exatamente 0,15ml da suspensão.

7. Colocar no centro de uma lâmina de microscopia o conteúdo da pipeta. Cobrir a gota com uma lamínula de 22 x 44mm (torna-se mais fácil fazer a contagem sem a lamínula, visto que, ocasionalmente, os ovos podem escorrer para fora da mesma).

8. Examinar sistematicamente a preparação com objetiva de pequeno aumento. Contar o número de ovos e multiplicar por 100. O resultado fornecerá o número de ovos/ml ou ovos/g (OPG). Correções deverão ser feitas conforme a natureza das fezes, como foi descrito no método original de Stoll.

Métodos Coprológicos Quantitativos Específicos para o Diagnóstico do *Schistosoma mansoni*[1,8,9,11,12,23,24,31]

Diferentes métodos coprológicos quantitativos são indicados para o diagnóstico da esquistossomose mansônica; os mais utilizados são os de Bell[5], de Barbosa[2], de Kato-Katz[17,18,19] e de Teesdale[29].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Método de Bell

O método coprológico quantitativo de Bell[5] é indicado para o diagnóstico da esquistossomose mansônica.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas). Não usar fezes preservadas.

Aparelho de Bell

O aparelho é constituído de duas peneiras de náilon superpostas. O método baseia-se na filtração sob vácuo da suspensão de fezes através de duas telas de náilon (500μm e 350μm de abertura, respectivamente). Esse conjunto de peneiras é colocado sobre um funil de *Buchner*, de porcelana, com o fundo perfurado em crivo, sobre o qual é colocado um filtro de papel (Whatman 541) que retém os ovos de *S. mansoni*. Os ovos são facilmente visualizados e contados ao microscópio quando o sedimento é corado pela solução saturada de ninhidrina ($C_9H_6O_4$)[15].

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colher e pesar as fezes emitidas em 24 horas. Colocar o material fecal total em copo graduado ou em *beaker* de 2.000ml. Completar o volume de 100ml com solução de formaldeído a 10% e misturar vigorosamente.

3. Completar o volume da suspensão juntando 900ml de água corrente.

4. Homogeneizar toda a suspensão com um misturador elétrico durante 15 minutos.

5. Colher exatamente 50ml da suspensão. Com seringa de 10ml, aspirar 1ml da suspensão de fezes e transferir para a primeira peneira (tela de 500μm).

6. Lavar a seringa e a tela várias vezes, pela passagem de 10ml de água corrente. Filtrar, sob vácuo, a suspensão.

7. Os ovos de *S. mansoni* são retidos no papel-filtro (Whatman 541) colocado sobre um funil de *Buchner* de porcelana.

8. Retirar e mergulhar, durante 10 minutos, o papel-filtro do funil de *Buchner* na solução saturada de ninhidrina.

9. Deixar o filtro secar durante a noite à temperatura de 37°C ou durante 10 minutos a 60°C.

10. Examinar sistematicamente a preparação com objetiva de pequeno aumento. Contar todos os ovos contidos no papel-filtro. Bell recomenda recortar o papel-filtro na forma de uma lâmina de microscopia, a qual é coberta com uma lamínula.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Método de Barbosa

O método descrito por Barbosa[2] é o resultado da modificação da técnica de sedimentação espontânea.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas). Não usar fezes preservadas.

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colocar cerca de 5g de fezes, coletadas de várias partes do bolo fecal, em copo graduado ou em *beaker* de 250ml. Completar o volume de 50ml com água corrente.

3. Filtrar a suspensão através de gaze levemente umedecida, dobrada duas vezes e receber o filtrado em uma proveta graduada com tampa de 50ml.

4. Deixar em repouso durante 60 minutos.

5. Decantar com cuidado o líquido sobrenadante, sem perder nenhuma porção do sedimento.

6. Determinar o volume do sedimento e agitar vigorosamente a proveta na posição invertida durante um minuto.

7. Colher com pipeta graduada 0,1ml do sedimento.

8. Examinar sistematicamente a preparação com objetiva de pequeno aumento. Contar o número de ovos.

9. Calcular o número de ovos por grama de fezes (OPG) de *S. mansoni* com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{N.° de ovos por lâmina x Volume do sedimento}}{\text{Volume do sedimento x Peso da amostra de fezes}}$$

Método de Kato-Katz

O método do esfregaço espesso de celofane, introduzido por Kato e Miura[16], aperfeiçoado e avaliado por Kato[17], e estudado por Komiya e Kobayashi[20], Martin e Beaver[21], Chaia e cols.[7], Katz, Coelho e Pellegrino[18] e modificado por Katz, Chaves e Pellegrino[19] é amplamente usado na rotina para determinar quantitativamente o número de ovos. De acordo com esses autores, este método é um procedimento simples e muito eficiente para detectar ovos de helmintos nas fezes principalmente de *Schistosoma*, entretanto, não é indicado para o diagnóstico de larvas de helmintos e protozoários.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

O método modificado de Kato-Katz quantifica uma pequena porção de fezes, combinando um cartão retangular de papelão (ou plástico), com pequeno orifício central[19] e o esfregaço espesso de fezes[16,17]. O procedimento demonstra possuir excelente sensibilidade e reprodutibilidade.

A grande vantagem do método é o uso de significativa porção de fezes (50 a 60mg), a qual é examinada diretamente sem o emprego de outros procedimentos de concentração. O método usa lamínulas de celofane, previamente mergulhadas em solução aquosa de glicerina e verde de malaquita. A intensidade de luz necessária durante o exame microscópico desse método é no mínimo duas vezes maior do que a requerida pelo exame direto a fresco, por esta razão o verde de malaquita é usado para propiciar proteção aos olhos[30] e tornar os ovos mais visíveis.

No método de Kato-Katz é obrigatório o uso de amostras fecais frescas ou refrigeradas (por um período de tempo pequeno), não possibilitando o uso de espécimes preservados pelos fixadores tradicionais, os quais promovem liquefação e diluição, afetando, possivelmente, as propriedades de clarificação da mistura de glicerina, prejudicando a execução do método.

A adição de azida sódica (NaN_3), em pó às amostras fecais constituiu-se em excelente procedimento para impedir alterações da morfologia dos ovos, evitar a embriogênese e diminuir a atividade dos microrganismos presentes nas fezes, sem alterar a concentração dos ovos[6,14]. A azida sódica, pó, preserva as amostras fecais permitindo o exame pelo método de Kato-Katz[6,14]. A azida sódica é tóxica e deve ser transportada com cuidado.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas). Não usar fezes preservadas.

Reagentes

1. Verde de malaquita (CI 42000) $[C_{23}H_{25}N_2)_2.3C_2H_2O_4]$
2. Fenol fundido a 44°C (C_6H_6O)
3. Glicerina ($C_3H_8O_3$)

Solução Aquosa Glicerinada de Verde de Malaquita

Solução aquosa de verde de malaquita a 3% (m/v)	1ml
Solução aquosa de fenol a 6% (m/v)	100ml
Glicerina	100ml

Material

1. Lamínula de celofane molhável de espessura média e 20 x 26mm em tamanho.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Lâmina comum de microscopia (26 x 76mm).

3. Tela de metal (60 ou 80 malhas) ou de náilon (105 malhas).

4. Cartão retangular (3cm x 4cm x 1,37mm) com um orifício central de 6mm de diâmetro.

5. Palito de madeira ou de plástico.

6. Papel absorvente.

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colocar a amostra fecal sobre o papel absorvente.

3. Comprimir a tela metálica ou de náilon sobre as fezes, fazendo com que parte passe através das malhas (Fig. 5.2A).

4. Remover as fezes que passam através das malhas e transferi-las para o orifício do cartão, colocado sobre a lâmina (Fig. 5.2B).

5. Depois de encher o orifício central, remover com cuidado o cartão, deixando as fezes na lâmina.

6. Cobrir as fezes com a lamínula de papel celofane, invertendo e pressionando a lâmina sobre o papel absorvente (Fig. 5.2C).

7. Deixar a preparação em repouso (clarificação) durante 30 minutos a 34-40°C ou à temperatura ambiente por uma a duas horas.

8. Examinar a preparação ao microscópio (Fig. 5.3).

Cálculo

O número de ovos presentes no material fecal (lâmina) multiplicado pelo fator 24 resulta, aproximadamente, no número total de ovos por grama (OPG) de fezes.

Observações

1. A lamínula de papel celofane permeável deve ser previamente tratada, por no mínimo 24 horas, com solução de verde de malaquita em glicerina.

2. Com a evaporação da água, a glicerina age sobre o esfregaço fecal, clarificando-o. Essa técnica, além de simples, permite a estocagem da lâmi-

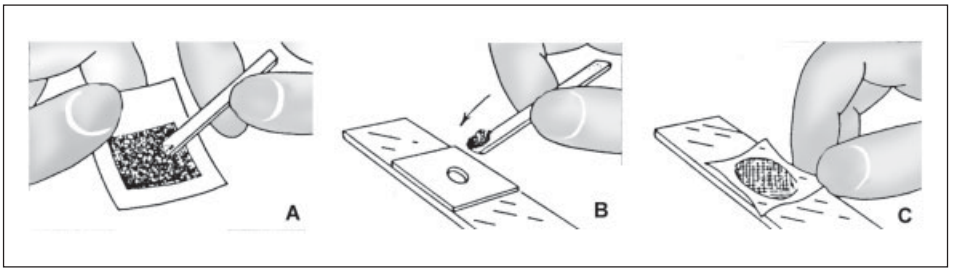


Fig. 5.2 — *Método de Kato-Katz.*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

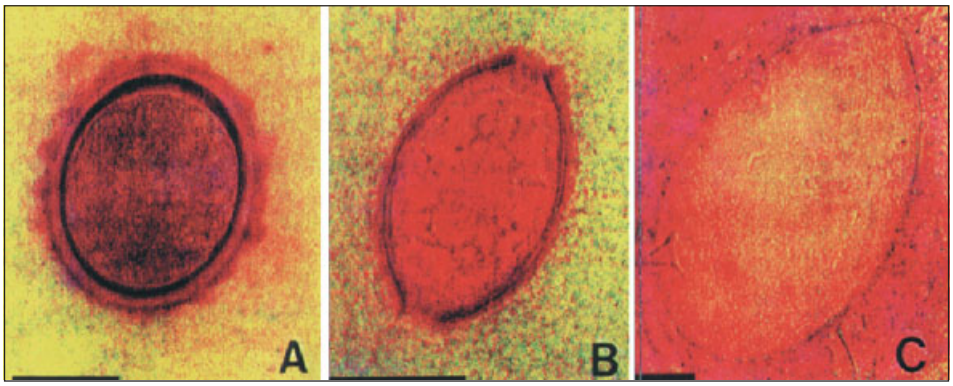


Fig. 5.3 — *Preparações de ovos de helmintos pelo método de Kato-Katz; A)* Ascaris lumbricoides*; B)* Trichuris trichiura*; C)* Schistosoma mansoni*. Barra = 25mm. (Imagens reproduzidas do Beach Aids for the Diagnostic of Intestinal Helminths, Programme on Intestinal Helminths, Division of Communicable Diseases, WHO, Genebra.)*

na preparada para leitura posterior, tornando possível a adoção de esquemas de supervisão do diagnóstico laboratorial e facilitando seu emprego em condições de trabalho de campo[15].

3. Nessas circunstâncias, de acordo com Coura e Conceição[10], impõe-se facilidades operacionais.

4. É desaconselhável, entretanto, seu uso em amostras fecais diarréicas[15].

5. Suzuki e Sanbe[27] empregaram um cartão retangular de papelão (3cm x 4cm x 1,42mm) com um orifício central de 7mm de diâmetro. O cálculo de OPG é o resultado da multiplicação do número de ovos presentes na preparação pelo fator 18,5.

Método de Teesdale e Amin

Esse método descrito por Teesdale e Amin[29] assemelha-se ao método de Kato-Katz sob o aspecto metodológico, diferindo deste pelo fato de se obter o esfregaço das fezes a serem examinadas através de pressão entre duas lâminas de microscopia[15].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ash LR, Oriehl TC. Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. Chicago, Ill: ASCP Press, 1991.
2. Barbosa FS. Morbidade na esquistossomose. Ver Bras Malar D Trop, 3:159, 1967.
3. Beaver PC. Quantitative hookworm diagnosis by direct smear. J Parasitol, 35:125-135, 1949.
4. Beaver PC. The standardization of fecal smears for estimating egg production and worm burden. J Parasitol, 36:451-455, 1950.
5. Bell DR. A new method for counting *Schistosoma mansoni* eggs in faeces with special reference to therapeutic trials. Bull WHO, 54:703-705, 1963.
6. Bundy DAP, Foreman JDM, Golden NHN. Sodium azide preservation of fecal specimes for Kato analysis. Parasitology, 90:463-469, 1985.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

7. Chaia G, Chaia ABQ, McAaullife J, Katz N, Gasper D. Coprological diagnosis of schistosomiasis. II Comparative study of quantitative methods. Rev Inst Med Trop (São Paulo), 10:349-353, 1968.

8. Chaia G. Diagnóstico de laboratório. Comprovação parasitológica coproscópia. In: Cunha AS ed. *Esquistossomose mansoni*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 201-206, 1970.

9. Chaves A, Alcântara OS, Carvalho, OS, Santos JS. Estudo comparativo dos métodos coprológicos de Lutz, Kato-Katz e Faust modificado. Rev Públ S Paulo, 13:348-352, 1979.

10. Coura JR, Conceição, MJ. Estudo comparativo dos métodos de Lutz, Kato e Simões Barbosa no diagnóstico coprológico da esquistosomose mansoni. Rev Soc Bras Med Trop, 8:153-158, 1974.

11. Cunha AS. *Esquistossomose mansoni*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1970.

12. Garcia LS, Bullock-Iacullo S, Palmer J et al. Diagnosis of parasitic infections: collections, processing and examination of specimens. In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 1.1.4.5-1.1.5.8, v.2, 1992.

13. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3rd ed. Washington (DC): ASM Press, 1997.

14. Gonçalves EMN, Campos R, Neto Amato V, Pinto PLS, A.A.B. Moreira AAB. Emprego da azida sódica, como conservador de fezes, para a pesquisa de ovos de *Schistosoma mansoni* pelo método de Kato-Katz. Rev Soc Bras Med Trop, 21:59-62, 1988.

15. Hoshimo-Shimizu S, Kimura RT, Chieff PP. Esquistossomose mansônica. In: Ferreira AW, Ávila SLM ed. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 185-193, 1996.

16. Kato K, Miura M. Comparative examination. Jpn J Parasitol, 3:25, 1954. (Texto em Japonês)

17. Kato K. A correct application of the thick-smear technic with cellophane paper cover. A Pamphlet, 1-9, 1960. (Texto em Japonês)

18. Katz N, Coelho PMZ, Pellegrino J. Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *S. mansoni* eggs added to human feces. J Parasitol, 56:1030-1033, 1970.

19. 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.

20. Komiya Y, Kobayashi A. Evaluation of Kato's thick-smear techinic with a cellophane cover for helminth eggs in feces. Jap J Med Sci Biol, 19:59-64, 1966.

21. Martin LK, Beaver PC. Evaluation of Kato thick-smear technique for quantitative diagnosis of helminth infections. Am J Trop Med Hyg, 17:382-391, 1968.

22. Melvin DM, Brooke MM. Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites. 3rd ed. HHS publication N.° (CDC) 82-8282. Atlanta: Laboratory Training and Consultation Division, Centers for Disease Control, 1982.

23. Nuñez-Fernandez FA, Sanjuro Gonzalez E, Finlay CM, Villalvilla CM. Camparación de várias técnicas coproparasitológicas para el diagnóstico de geohelmintiasis intestinalis. Rev Inst Med Trop S Paulo, 33:403-406, 1991.

24. Rabelo ALT. Parasitological diagnosis of schistosomiais Mansoni: fecal examination and rectal biopsy. Mem Inst Oswaldo Cruz, 87(Suppl IV):325-331, 1992.

25. Stoll NR. Investigations on the control of hookworm disease. XV. An effective method of counting hookworm eggs in feces. Am J Hyg, 3:59-70, 1923.

26. Stoll NR, Hausheer WC. Concerning two options in dilution egg counting; small drop and displacement. Am J Hyg, 6(Suppl):134-145, 1926.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

27. Suzuki R, Sanbe T. Evaluation of Katz's quantitative method and it's improvement. Jpn J Parasitol, 26(Suppl):35, 1977. (Texto em Japonês)

28. Suzuki N. Diagnostic method in intestinal helminth infections. In: Yokogswa M ed. Collect Papers on the Control of Soil-transmitted Helminthiases. Tokyo: APCO Research Group, 25-33, v.1, 1980.

29. Teesdale CH, Amin MAA. A simple tick-smear technique for the diagnostic of *Schistosoma mansoni* infection. Bull WHO, 54:703-705, 1976.

30. Vajrasthira S. Laboratory techniques for examination of soil-transmitted helminths. In: Soil-transmitted helminthiasis and laboratory diagnosis. Departament of Helmintology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand, 37-60, 1992.

31. Willcox HP, Coura JR. The efficiency of Lutz, Kato-Katz and Baermann-Moraes (adapted) techniques association to the diagnosis of intestinal helminths. Mem Inst Oswaldo Cruz, 86:457-460, 1991.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CAPÍTULO 6



Artefatos que Podem Ser Confundidos com Organismos Parasitos

Geraldo Attilio De Carli

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os problemas encontrados na diferenciação dos enteroparasitos dos detritos fecais, que se assemelham entre si, são um fato comum para o pessoal do laboratório de Parasitologia, em particular para aqueles que não possuem experiência no diagnóstico parasitológico. As fezes consistem em vários elementos, entre os quais estão incluídos: a) restos de alimentos não digeridos; b) material alimentar digerido; c) células epiteliais, muco e outras secreções do trato intestinal, e d) vários tipos de microrganismos, tais como bactérias e leveduras. Considerando a relação entre detritos alimentares e parasitos, não é surpresa que muitos resíduos sejam responsáveis por uma incorreta identificação de trofozoítos e cistos de protozoários e ovos e larvas de helmintos. Treinamento apropriado, observância dos protocolos, controle de qualidade, bibliografia referencial e instrutores capacitados minimizarão a identificação dos erros.

Diferentes espécies de elementos microscópicos encontrados em secreções e excreções do homem são erroneamente identificados e confundidos com parasitos humanos. Esses pseudoparasitos apresentam características semelhantes às dos parasitos, como também aos seus estágios de desenvolvimento, embora não sejam parasitos ou parasitem o hospedeiro em questão. O melhor termo seria pseudo-simbiontes[5]; o termo pseudoparasitos tem sido usado por alguns autores para designar or-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

ganismos comensais, tais como a *Entamoeba coli*[5]. Muitos objetos, como pequenas células intestinais, fragmentos de carne e de vegetais ingeridos como alimento e pólen contaminando os alimentos, podem assemelhar-se morfologicamente aos ovos de parasitos humanos nas fezes. Ácaros e seus ovos são freqüentemente encontrados nas fezes humanas. Eles podem ser diferenciados dos ovos dos parasitos por suas formas distintas, superfície irregular de sua casca, ou pela estrutura semelhante à casca e pelo conteúdo que difere das células dos ovos segmentados e não segmentados. Muitas vezes torna-se difícil distinguir os ovos de zooparasitos ou fitoparasitos daqueles dos parasitos humanos[10].

Freqüentemente, fragmentos de alimentos, células vegetais, grãos de pólen, leucócitos, células de tecido animal 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 (Fig. 6.1)[2]. Os exames macroscópico e microscópico das fezes podem ser dificultados pela presença de artefatos, que se assemelham aos parasitos (trofozoítos, cistos, ovos, larvas de vermes adultos). Muitos desses artefatos surgem de uma grande lista de produtos vegetais e animais que são ingeridos diariamente pelo homem. Células humanas de origem intestinal podem, na sua aparência, imitar protozoários patogênicos ou comensais. Infecções espúrias com parasitos humanos e de origem animal acontecem após a ingestão de carne contaminada ou infectada. Na realidade, um material fecal inadequadamente colhido, velho ou mal preservado oferece outros mecanismos pelos quais os espécimes podem ser contaminados com organismos desconhecidos. Gradwohl e Kouri[3] dividiram os pseudoparasitos microscópicos em dois grupos: 1) elementos em trânsito e 2) elementos derivados de contaminação externa.

Elementos em Trânsito

Neste grupo estão incluídos todos os pseudoparasitos microscópicos encontrados nas fezes, os quais são simples elementos de trânsito através do trato digestivo. Esses elementos são ingeridos junto aos alimentos e igualmente passam com ou sem modificações, sendo eliminados com as fezes. Ovos e larvas de nematóides de animais ou de vegetais são ingeridos pelo homem com os alimentos de origem animal ou vegetal, passando através do trato alimentar sem causar parasitismo. A variedade e regularidade de material vegetal encontrado nas fezes pode causar confusão. Os ovos de nematóides parasitos de raízes de plantas não são digeridos e, freqüentemente, são encontrados nas fezes humanas. Esses ovos de nematóides dos gêneros *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Pratylenchus* etc. têm casca fina e hialina, sendo achatados em um lado, com forma elipsóide-alongada (ovóide), com as extremidades arredondadas e apresentando embriões em vários estádios de desenvolvimento. Exemplos: ovos de *Heterodera marioni* (Fig. 6.2), ovos embrionados de *Heterodera radicicola*, ovos de *Heterodera glycines*, ovos de *Meloidogyne hapla*, ovos de *Meloidogyne javanica*, ovos de *Meloidogyne incognita* e ovos de *Meloidogyne* sp. (Fig. 6.3). Os ovos de *Meloidogyne* sp. podem ser confundidos com os ovos de *Trichostrongylus*, de ancilostomídeos ou com ovos inférteis de *Ascaris lumbricoides*. Entre

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

os vegetais comestíveis que podem se apresentar parasitados por *Meloidogyne* no Brasil estão cenoura, batatinha, margarito, mandioquinha, rabanete, aipo, nabo etc.[6,7]. Larvas de *Anguillula aceti*, ingeridas no vinagre com azeite e em certos líquidos fermentados, ovos e adultos de ácaros, especialmente *Tyroglyphus* sp., *Tyrophagus dimidiatus* (Fig. 6.4), *Cheyletus* e *Tarsonemus*, são freqüentemente encontrados nas fezes humanas pelo exame parasitológico das fezes. Aceita-se que estes ácaros são ingeridos acidentalmente com os alimentos, mas existem dúvidas se eles são patogênicos ou não quando deglutidos[3,10]. A mais freqüente ocorrência de dípteros e de seus ovos nas fezes humanas é a da *Carpoglyphus lactus*, provavelmente habitante da pasta de soja ou do açúcar[10]. Miíase intestinal ou o desenvolvimento de larvas de moscas no intestino pode ocorrer no homem. Com muita freqüência, são encontradas nas fezes partes ou todo o corpo do inseto, como resultado de sua ingestão com os alimentos. Larvas vivas nos espécimes fecais podem indicar uma miíase ou uma contaminação do espécime. Neste caso, é importante acertar o método de colheita das amostras fecais, particularmente se elas forem obtidas fora do hospital ou do laboratório[2,4,5]. Ocasionalmente, ovos do nematóide *Capillaria* e de certos trematódeos, como a *Fasciola hepatica*[2,8,9], podem ser acidentalmente ingeridos e passar inalterados através do trato gastrintestinal. Leucócitos, fungos, leveduras e células epiteliais podem ser confundidos com protozoários, enquanto certas concreções intestinais, células vegetais, fibras de carne, vasos espiralados, pêlos de plantas, grânulos, grãos de pólen, cristais, bolhas de ar e de óleo são facilmente confundidos com ovos e larvas de helmintos (Fig. 6.1). Os grãos de pólen e estruturas similares são regulares em forma e freqüentemente estão presentes em grande número. Sua regularidade e abundância pode sugerir que eles sejam alguma forma evolutiva de um parasito. A Fig. 6.5 mostra estruturas, encontradas nas fezes de pacientes submetidos a uma dieta suplementar com *Australian bee pollen*, com morfologia semelhante aos ovos de *Trichuris trichiura*[2,5].

Elementos Derivados de Contaminação Externa

O material fecal pode ser contaminado por elementos microscópicos lançados aos espécimes fecais após a colheita. Essa contaminação externa é devida à vidraria suja, como também a certas amebas e ciliados de vida livre; larvas de dípteros; leveduras e grãos de pólen.

Protozoários

Algumas células e outros organismos podem facilmente ser confundidos com protozoários intestinais (Tabela 6.1)[2].

Amebas: Ocasionalmente as amebas de vida livre são encontradas nas fezes ou como contaminantes na água. Morfologicamente os trofozoítos desses organismos diferem das amebas parasitas por possuírem um ou mais vacúolos contráteis e uma fina membrana cística. Outra característica diferencial está

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte



Fig. 6.1 — *Artefatos encontrados nas fezes humanas, que podem causar confusão no diagnóstico parasitológico. 1) Pré-cisto de* Entamoeba histolytica*; 2) Macrófago; 3) Leucócito, neutrófilo polimorfonuclear; 4) Célula epitelial escamosa, obtida através de aspirado retal; 5) Célula plasmática, obtida através de aspirado retal; 6)* Blastocystis hominis *(classificado como protozoário); 7) Células de levedura; 8) Unidades separadas de micélio de* Monilia*; 9,10) Conídia de fungo* Alternaria *e* Helminthosporium*; 11) Cristais de Charcot-Leyden; 12) Cristais de colesterol; 13) Partículas de caseína parcialmente digeridas; 14) Bolha de ar; 15) Gota de óleo; 16a, 16b) Diatomáceas; 17a) Pinheiro; 17b) Violeta africana; 17c)* Hibiscus*; 17d) Sálvia; 17e) Losna; 17f)* Phleum pratense*; 18) Cabelo de planta; 19) Fragmento de fibra de algodão; 20) Cabelo de mamífero; 21-32) Resíduos de alimentos; 21) Músculo de carne bovina ou suína; 22) Carne de caranguejo; 23) Carne de peixe; 24) Grão de trigo; 25) Semente de cereal; 26) Vagem de feijão; 27) Feixe fibrovascular de tubos de condução; 28) Grão de amido de batata Irlandesa; 29) Amido de arroz; 30) Amido de pacova; 31) Amido de batata-doce; 32) Parede celular de material lenhoso. 1-12 x 1.125; 16a x 700; 16b x 200; 17-20 x ca. 300; 21-21 x ca. 240; 28-31 x ca. 750; 32 x 200. Observação: O* Blastocystis hominis *está classificado como ameba. (Desenhos originais de Faust EC. In: Faust EC, Beaver PC, Jung RC. Animal Agents and Vectors of Human Diseases. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1968.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

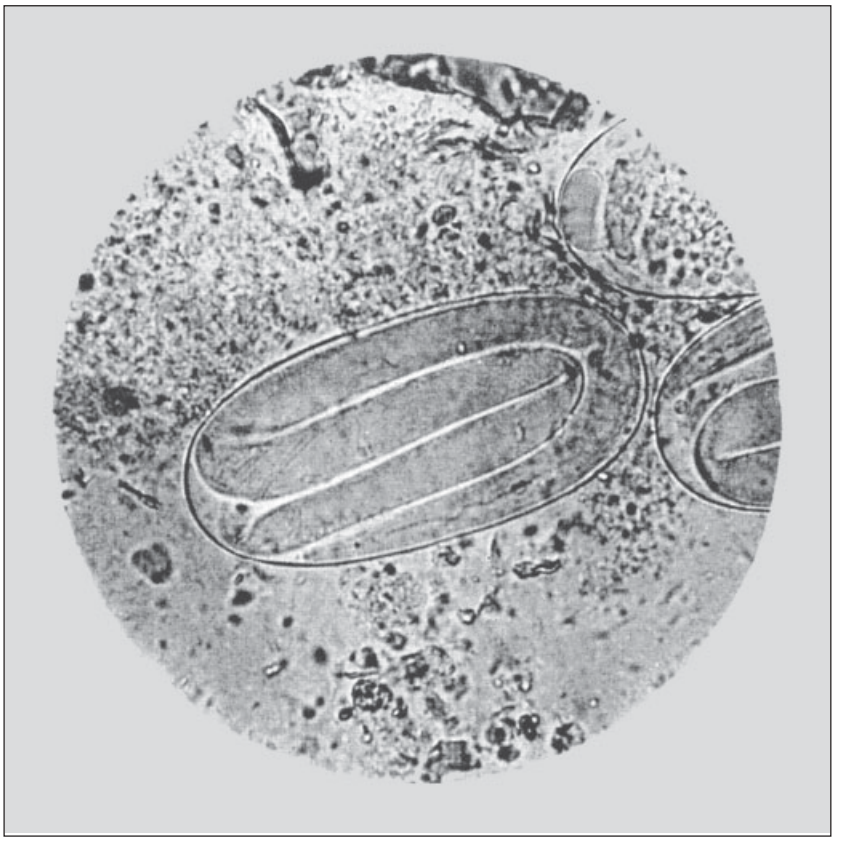


Fig. 6.2 — *Ovo embrionado de* Heterodera marioni. *(Segundo Gradwohl RBH, Kourí P. Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. Parasitology and Tropical Medicine. 4th ed. St. Louis: CV Mosby Co., 1948. v.3.)*

relacionada com as exigências culturais; enquanto que os organismos de vida livre crescem facilmente nos meios de cultura, as amebas patogênicas

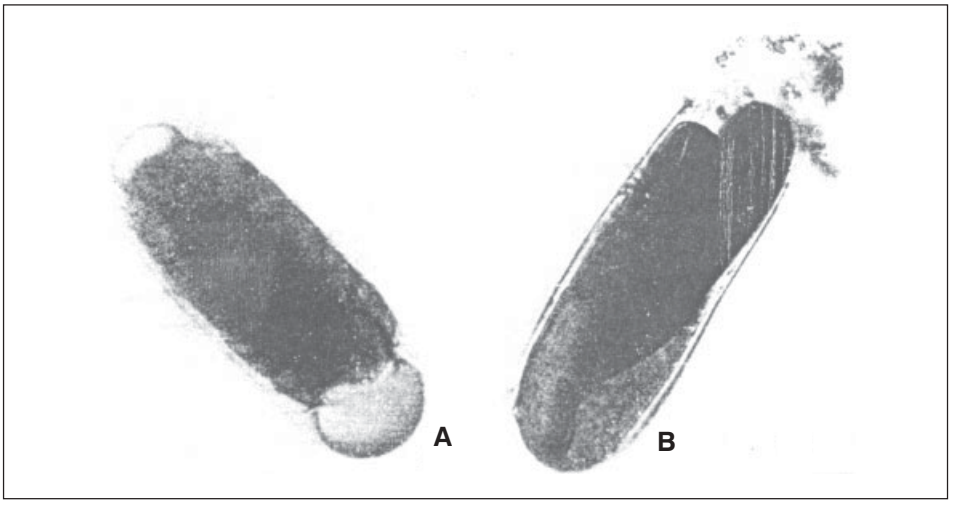


Fig. 6.3 — *Ovo de* Meloidogyne *sp. (Família Heteroderidae) nas fezes humanas. A) ovo morulado; B) ovo embrionado. (Segundo Pessôa SB, Martins AV. Pessôa. Parasitologia Médica. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte



Fig. 6.4 — *Ovo e adulto de* Tyrophagus dimidiatus. *(Segundo Suzuki N. Human Helminth Eggs. Tokyo: JAPC & JOICFP, 1981.)*

necessitam de meios de cultura mais complexos para o seu desenvolvimento *in vitro*. As amebas isoladas do material fecal são *Entamoeba moshkovkii*, *Naeglaria gruberi*, *Hartmanella hyalina*, *Sappnia diploidea*, *Vahlkampfia punctata* e *V. lobospinosa*. Na colheita dos espécimes a contaminação das

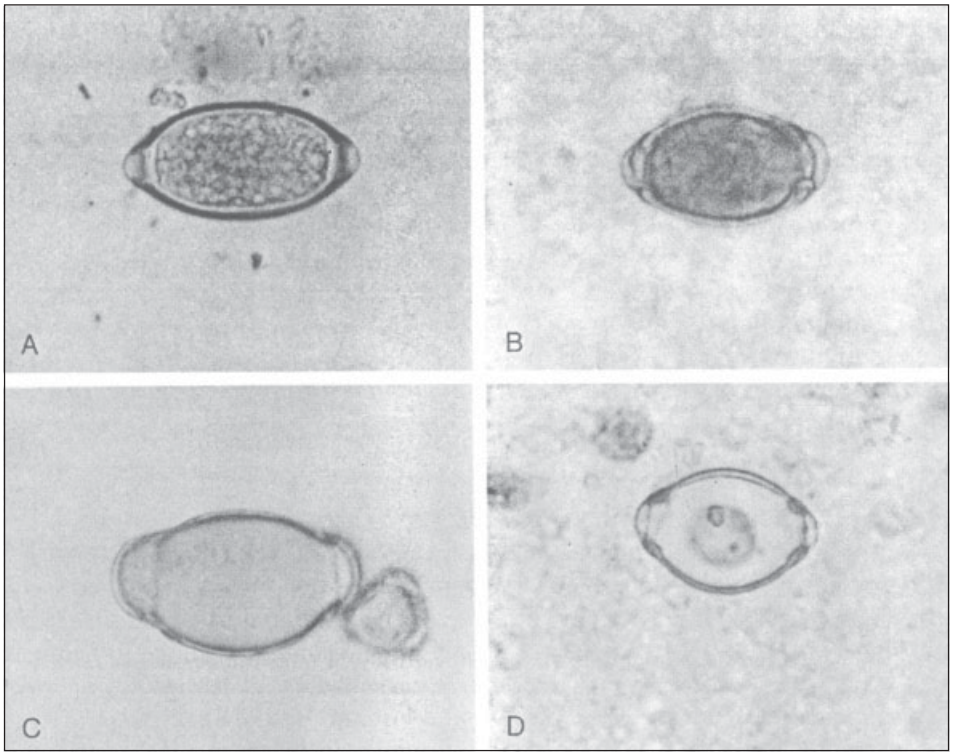


Fig. 6.5 — *A) Ovo de* Trichuris trichiura*; B, C, D) Artefatos semelhantes a ovos, nas fezes de pessoas que ingeriram "Australian bee pollen". (Segundo Markell EK, Voge M, John DT. Medical Parasitology. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders Co., 1992.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

amostras fecais pode ser evitada pelo uso de recipientes limpos e secos e pelo emprego da solução salina ou do formaldeído na diluição e na preservação das fezes e/ou para a fixação rápida ou o exame do material fecal imediatamente após a passagem. Alguns protozoários, tais como *Entamoeba coli*, podem apresentar fungos no citoplasma (*Sphaerita* spp.) e no núcleo (*Nucleophaga* spp.). A *Sphaerita* spp. (algumas vezes chamada *Polyphaga* spp.) mede aproximadamente 0,5 a 1,0µm, com forma de cachos aglomerados[2].

Flagelados: Os flagelados aquáticos de vida livre podem ser identificados nas fezes contaminadas com água ou na solução salina e são dificilmente diferenciados dos flagelados entéricos. Amostras fecais contaminadas com urina podem conter *Trichomonas vaginalis* e a urina contaminada com fezes pode apresentar *Trichomonas hominis*.

Ciliados: Como as amebas e os flagelados, os ciliados de vida livre são freqüentemente encontrados na água estagnada, no esgoto e no solo, e podem ser observados no material fecal contaminado com água e solução salina. Os organismos reportados são a *Uronema nigricans*, *Lembus pusillus* e o *Balantiophorus minutis* (erroneamente chamado *Balantidium minutum*). Algumas espécies apresentam-se com características morfológicas semelhantes ao *Balantidium coli*[2].

Coccídios

***Cryptosporidium* spp.**: O *C. parvum* mede aproximadamente 4 a 6µm de diâmetro e se sobrepõe em tamanho a diversos elementos, incluindo fungos e artefatos, que são encontrados nas amostras fecais. Os oocistos e os esporozoítos são transparentes e de difícil visualização em esfregaços não-corados e somente são identificados através das colorações específicas derivadas de Ziehl-Neelsen. Os oocistos são facilmente confundidos com artefatos quando a coloração não foi bem realizada e pela morfologia não uniforme[2].

Isospora belli: Quando a parede cística da *Giardia lamblia* se retrai, o flagelado pode se assemelhar a oocistos da *Isospora belli* na forma imatura (não esporulados contendo um esporoblasto). Os oocistos maduros depois da excreção se dividem formando dois esporoblastos. Embora seja erro freqüente, a maneira mais fácil de diferenciar os dois organismos é pelo tamanho. Os cistos da *G. lamblia* medem aproximadamente 11 a 14µm de comprimento por 7 a 10µm de largura, enquanto os oocistos da *I. belli*, 20 a 33µm de comprimento por 10 a 19µm de largura. Essa situação mostra a importância da morfometria dos organismos para impedir um diagnóstico errado[2].

Microsporídios: Os esporos dos microsporídios humanos medem aproximadamente 1 a 4µm, variando entre 1 e 2µm. Os esporos são arredonda-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

dos ou ovais e podem se assemelhar a células de leveduras e a bactérias. Embora os organismos sejam corados pelas modificações do método do tricrômico e do Gram-*Chromotrope* a coloração é usualmente pálida. O tamanho dos organismos e a coloração se aproximam com os das leveduras ou com as bactérias presentes no espécime. A parede dos esporos dos microsporídios apresenta coloração do rosa ao vermelho; entretanto, algumas bactérias e artefatos coram-se de rosa-vermelho. O tamanho e a forma dos outros componentes fecais são de grande importância na diferenciação dos esporos de outras estruturas. Os esfregaços devem ser preparados finos para facilitar a penetração do corante[2].

***Leishmania* e *Trypanosoma*:** Nos esfregaços estirados, corados pelo método de Giemsa, as formas amastigotas da *Leishmania donovani* são encontradas dentro dos monócitos. O material nuclear cora-se em vermelho-púrpura-escuro, o citoplasma em azul-claro e o cinetoplasto, quando presente, em azulado-purpúreo. As formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, com localização extracelular (móveis no exame direto a fresco) coradas pelo método de Giemsa, apresentam reações de coloração semelhantes às da *L. donovani*, mostrando um visível cinetoplasto. A forma amastigota da leishmania pode assemelhar-se ao *Histoplasma capsulatum* quando a pequena barra da estrutura do cinetoplasto não é facilmente visível[2].

Helmintos[2]

Vermes adultos: Muitas variedades de vegetais parcialmente digeridos ou fibras de frutas são semelhantes na aparência aos nematóides adultos ou a proglotes de tênias. Esse episódio é comum com as pessoas nas quais o tempo do trânsito intestinal diminuiu devido à administração de purgantes. Nematóides adultos de vida livre podem ser identificados nas amostras fecais contaminadas com terra ou água[2].

Ovos de helmintos: Uma multiplicidade enorme de células de plantas, algas, grãos de pólen e conídios de fungos são rotineiramente vistos nas fezes e podem assemelhar-se ao *Ascaris lumbricoides*, *Taenia* spp., *Clonorchis sinensis* e a outros ovos de helmintos. Vegetais contaminados com ovos de insetos ou infectados com nematóides de plantas são a principal fonte de ovos com características similares, no tamanho e na forma, com as estruturas patogênicas. Pode ocorrer e resultar uma infecção espúria pela ingestão de uma grande quantidade de helmintos e de seus ovos por meio de produtos animais, como, por exemplo, carne de mamíferos, de peixes, de aves ou de outros hospedeiros. Entre outras, são citadas infecções pela *Fasciola hepatica*, *Dicroelium dendriticum* e *Capillaria hepatica*[2].

Larvas de helmintos: Diferentes espécies de plantas e pêlos de raízes mostram uma superficial semelhança no tamanho e na forma com larvas de nematóides. Entretanto, a maioria dessas estruturas vegetais são claras e refráteis, carecendo de simetria e de órgãos internos identificáveis.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Microfilárias: Para assegurar que as soluções corantes não estejam contaminadas com artefatos ou com organismos de vida livre, controlar, quando possível, todo o procedimento de coloração antes de usar os diferentes corantes para o diagnóstico da filariose no sangue. Pedaços de fibras de algodão, ciscos e outros componentes da poeira podem imitar as microfilárias quando corados. Entretanto, os artefatos não contêm internamente nenhum núcleo[2].

Sangue

Os artefatos presentes em esfregaços estirados e espessos do sangue podem ser confundidos com parasitos, apresentar resultados impróprios e/ou um tratamento desnecessário do paciente. Esses artefatos são usualmente de dois tipos: a) elementos celulares normais, tais como plaquetas, as quais podem ser confundidas com parasitos da malária quando superpostos nas hemácias; b) contaminação com fungos, bactérias ou fibras de celulose durante o procedimento de coloração, os quais podem levar à suspeita de uma fungemia, uma bacteremia ou uma parasitemia por malária ou microfilária. As plaquetas tendem a uma uniformidade de coloração, não apresentam estrutura interna, coram-se em vermelho e azul, mas as cores tendem ao púrpura. Outras estruturas internas das hemácias, como os corpos de Howell-Joly e anéis de Cabot, podem apresentar problemas na identificação[1,2].

Artefatos dos Líquidos Orgânicos

A aparência dos tufos de cílios soltos encontrados em uma variedade de líquidos orgânicos (especialmente líquidos do peritônio e da cavidade amniótica) tem sido relatada durante anos. Esses tufos são estruturas ciliadas remanescentes do epitélio que ocorrem como parte normal da queda em uma variedade de órgãos (trato respiratório e seio maxilar, ventrículos do cérebro, líquido cefalorraquidiano e trato geniturinário do homem e da mulher). No exame direto a fresco, estes tufos de cílios variam de 10 a 15μm de diâmetro e exibem movimentos rítmicos, podendo ser facilmente confundidos com protozoários ciliados e flagelados, incluindo o *Trichomonas* spp., o *Balantidium coli*, a *G. lamblia* e o *Chilomastix mesnili*. Entretanto, o exame direto a fresco ou o estudo de preparações permanentes coradas mostram pequenas estruturas internas remanescentes desses organismos[2].

Células Humanas

As células humanas que mais freqüentemente causam problemas na identificação são os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e os macrófagos (Tabela 6.1)[2].

Polimorfonucleares (PMN): Estas células encontram-se presentes em pacientes com infecção específica do intestino. Esses elementos devem ser reportados e quantificados (raros, poucos, moderados e muitos). Grande número de PMN são encontrados em pacientes com disenteria bacilar e podem também

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Tabela 6.1
Artefatos que se Assemelham com Organismos Parasitos

Material Clínico e Artefatos	*Semelhança*
Fezes	
Amebas de vida livre, flagelados e ciliados	Amebas parasitas, flagelados e ciliados
Helmintos de vida livre, ovos de helmintos ou ovos de insetos	Ovos de helmintos, larvas ou vermes adultos
Células de leveduras	*Cryptosporidium* spp., *Cyclospora* spp., microsporídios, ovos de helmintos e cistos de protozoários
Bactérias	Esporos de microsporídios
Fungos	Ovos de helmintos
Resíduos de plantas	
Células	Cistos de protozoários, ovos de helmintos
Pêlos de raízes	Larvas de nematóides
Grãos de pólen	Ovos de helmintos (*Ascaris* ou *Taenia*)
Cristais em suco de abacaxi	Cristais de Charcot-Leyden
Células humanas	
Neutrófilo polimorfonuclear (PMN)	
Sangue recém-colhido (células frescas)	PMNs normal em esfregaço de sangue
Sangue velho (células desintegradas)	Cistos de *Entamoeba histolytica*
Macrófago	Trofozoítos de *Entamoeba histolytica*
Células epiteliais	Trofozoítos de amebas
Sangue	
Plaquetas	Parasitos da malária, *Babesia* spp.
Inclusões anormais das hemácias (corpos de Howell-Jelly, anel de Cabot)	Parasitos da malária, *Babesia* spp.
Contaminantes	
Leveduras	Parasitemia fúngica
Bactérias	Bacteremia
Plantas ou fibras de poeira	Microfilárias
Precipitado de corante	Malária, *Babesia* spp.
Líquidos orgânicos	
Tufos de cílios desintegrados	Protozoários ciliados ou flagelados
Espécimes do trato respiratório	
Leveduras	*Pneumocystis carinii*, *Cryptosporidium* spp.
Urina	
Trichomonas hominis (contaminada com fezes)	*Trichomonas vaginalis*
Bactérias	Esporos de microsporídios

Adaptado de Garcia e Bruckner, 1997[2].

estar presentes em pacientes com amebíase intestinal e colite ulcerativa. Estas células devem ser diferenciadas da *Entamoeba histolytica*[2].

Macrófagos: Os macrófagos (monócitos) são células grandes, mononucleares e as células fagocitadas assemelham-se aos trofozoítos da *E. histolytica*. Esses elementos celulares podem ser encontrados em pacientes com amebíase intestinal e colite ulcerativa e devem ser diferenciados da ameba[2].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Eosinófilos: A identificação dos eosinófilos no material fecal usualmente indica a presença de uma resposta imune do hospedeiro. Esta resposta alérgica pode ser causada por uma infecção parasitária ou por outros antígenos, tais como pólen ou alimentos. Os eosinófilos possuem o mesmo tamanho dos PMN e são caracterizados pela presença de grandes grânulos corados em púrpura (tricrômico) e usualmente com núcleo bilobado, o qual pode estar obscurecido por grânulos[2].

Linfócitos: Os linfócitos apresentam um grande e denso núcleo corado em negro rodeado por um escasso citoplasma. Eles são aproximadamente 2/3 em tamanho dos PMN.

Hemácias: Em preparações concentradas (material fecal) poderão estar presentes algumas hemácias. Estas células medem aproximadamente 7,5μm (nas preparações a fresco) e quando presentes nas fezes são uma indicação de úlcera (parasítica ou não-específica) ou de outro problema vascular ou hemorrágico. Em esfregaços corados pelo método do tricrômico as hemácias apresentam-se redondas ou alongadas (distorção pode ocorrer durante a preparação do esfregaço) coradas em vermelho-púrpura. Elas não apresentam grânulos ou inclusões e algumas são menores de 7,5μm[2].

Cristais de Charcot-Leyden

Os cristais de Charcot-Leyden (CL) são formados pela desintegração dos produtos dos eosinófilos e dos basófilos, podendo estar presentes nas fezes ou no escarro, sozinhos ou juntos com os eosinófilos. Os cristais são estruturas finas com as extremidades pontiagudas; pela coloração do tricrômico coram-se em vermelho-púrpura. No mesmo material fecal poderão ser vistos vários cristais de CL com diferentes tamanhos. A presença dos cristais indica uma resposta imune, mas a causa principal é atribuída a uma infecção parasitária. A presença dos eosinófilos e/ou dos cristais de CL nas fezes pode não estar correlacionada com o aumento da eosinofilia na corrente sangüínea. A identificação de cristais de CL nos líquidos orgânicos e nas secreções é considerada como um indicador de eosinofilia associado a uma inflamação alérgica. Cristais semelhantes aos de CL são encontrados no suco do abacaxi, na fruta fresca, conservada e/ou enlatada[2].

Elementos Não-humanos Encontrados nas Fezes (Células de Leveduras)

Inúmeras células de leveduras redondas e ovais, medindo aproximadamente 4 a 8μm, podem ser encontradas no material fecal. No exame direto a fresco esses organismos assemelham-se a pequenos cistos (*Endolimax nana* ou *Entamoeba hartmanni*) apresentando uma coloração irregular (do vermelho ao verde pelo corante tricrômico), sem mostrar inclusões. Entretanto, quando presentes, essas inclusões assemelham-se ao cariossoma dos

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

pequenos protozoários. A pesquisa de leveduras em brotamento e/ou de pseudohifas é de extrema importância (os espécimes frescos preservados imediatamente após a colheita apresentam grande relevância clínica). A presença de pseudomicélios pode ser uma indicação de patogenicidade de um determinado fungo (usualmente *Candida* spp.). Um grande número de leveduras em brotamento em espécimes frescos ou preservados indica uma potencial fonte de infecção sistêmica, particularmente em pacientes imunocomprometidos[2].

Infecções Espúrias

Infecções espúrias ocorrem quando o homem ingere fígado de diferentes animais. Os ovos são digeridos livremente quando o fígado é comido, passando esses estágios inalterados junto com as fezes durante vários dias. Inúmeros exames parasitológicos das fezes para a pesquisa de ovos e de parasitos devem ser realizados para excluir uma infecção verdadeira. Ovos de *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium dendriticum* ou *Capilaria hepatica* estão presentes no fígado de bovinos, de ovinos e de roedores, respectivamente. Ocasionalmente, ovos raros são encontrados nas fezes e podem representar uma infecção espúria adquirida pela ingestão de carne de peixes, de pássaros e de outros animais vertebrados e invertebrados[2].

Larvas de Insetos

Não é comum o encontro de larvas de insetos nas fezes, mas a contaminação ocorre como resultado da ingestão de larvas ou de insetos junto com os alimentos. A presença de larvas vivas sugere uma miíase ou provavelmente uma contaminação do material fecal. Nesta situação é importante saber quando o espécime foi colhido e se foi submetido ao laboratório fresco ou preservado. Fezes obtidas de privadas (latrinas) não podem ser aproveitadas, não somente devido ao risco de contaminação, mas porque a água e a urina poderiam destruir as formas trofozoíticas[2].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Faust EC, Beaver PC, Jung RC. Animal Agents and Vectors of Human Diseases. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1968.
2. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3rd ed. Washington (DC): ASM Press,1997.
3. Gradwohl RBH, Kourí P. Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. Parasitology and Tropical Medicine. 4th ed. St. Louis: CV Mosby Co., v.3, 1948.
4. Insenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington, DC: ASM Press, v.2, 1992.
5. Markell EK, Voge M, John DT. Medical Parasitology. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders Co., 1992.
6. Pessôa SB. Parasitologia Médica. 7a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1967.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

7. Pessôa SB, Martins AV. Pessôa. Parasitologia Médica. 11a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.
8. Rey L. Parasitologia. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
9. Rey L. Base da Parasitologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1992.
10. Suzuki N. Human Helminth Eggs. Tokyo: JAPC & JOICFP, 1981.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Capítulo 7



Expressão dos Resultados no Exame Parasitológico das Fezes

Geraldo Attilio De Carli

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O resultado do exame parasitológico das fezes tem como objetivo cinco propósitos principais: fornecer informações úteis ao diagnóstico; servir como guia para o tratamento; acompanhar e determinar a eficiência do tratamento; trazer informações de valor para estudos epidemiológicos; e fornecer os elementos básicos para corrigir as deficiências nos programas de profilaxia do meio ambiente. **Todos os parasitos patogênicos ou não-patogênicos deverão ser reportados nos seus nomes científicos, dando ênfase ao estágio de diagnóstico identificado.**

Os nomes científicos obedecem às regras de nomenclatura binária, sendo formados por um nome genérico e um nome específico. **Os nomes científicos são sempre grifados, ou escritos em itálico ou em negrito**[4]. Exemplos:

Ovos de *Ascaris lumbricoides*,
Ovos de **Ascaris lumbricoides**, ou
Ovos de Ascaris lumbricoides.

Cistos de *Giardia lamblia*,
Cistos de **Giardia lamblia**, ou
Cistos de Giardia lamblia.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Larvas de *Strongyloides stercoralis*,
Larvas de **Strongyloides stercoralis**, ou
Larvas de Strongyloides stercoralis.

Quando não forem encontrados parasitos no exame, o resultado deverá ser referido como:

"**Não foram vistos ovos, larvas e cistos de parasitos**"
ou
"**Não foram vistos ovos, larvas e cistos de parasitos no material enviado**".

Todos os helmintos são estimados como patogênicos ou potencialmente patogênicos. Entretanto, alguns protozoários intestinais são considerados como comensais ou não-patogênicos. Mesmo assim, os estágios de diagnóstico desses parasitos deverão ser referidos no resultado enviado ao clínico. Eventualmente protozoários, em especial as amebas, quando não forem especificamente identificados, deverão ficar por um determinado tempo sem um diagnóstico definitivo, pois um resultado equivocado não poderá ser informado ao clínico.

A *Entamoeba histolytica* é usada para designar a existência de zimodemos patogênicos, enquanto que *E. dispar* é agora usada para designar a existência de zimodemos não-patogênicos. Entretanto, apesar de os trofozoítos (*E. histolytica*) conterem hemácias ingeridas, os dois organismos não podem ser diferenciados tomando como base a morfologia no estudo de esfregaços fecais permanentes corados[1,2].

Recomendam-se os seguintes laudos:

"**Organismos semelhantes a *Entamoeba histolytica***"
ou
"**Ameba com características morfológicas semelhantes a *Entamoeba histolytica***"
ou
"**Ameba não identificada presente no material enviado**".

Uma observação poderá acompanhar os resultados enviados ao clínico:

"**Ameba em identificação através de coloração permanente** (hematoxilina férrica ou pelo tricrômico)"
ou
"**Trofozoítos de *Entamoeba histolytica/E. dispar***".

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Trofozoítos, cistos, oocistos e esporos de protozoários, ovos e larvas de helmintos também poderão apresentar problemas na sua identificação e, conseqüentemente, o resultado deverá ser o seguinte:

"**Flagelados e/ou ciliados não identificados**".
"**Ovos e/ou larvas de nematóides não identificados**".
"Ovos de cestóides e de trematódeos não identificados".
"**Oocistos de coccídios não identificados**".
"**Esporos de microsporídios não identificados**".

Existe unanimidade entre os autores nas informações que deverão constar nos resultados a serem enviadas ao clínico, como gênero e espécie e estágio de diagnóstico (ovos, larvas, cistos, oocistos e/ou esporos). Quanto à quantificação, alguns parasitologistas são de opinião que as infecções pelos trematódeos intestinais deverão ser expressas quantitativamente, e também quando forem encontrados e identificados os parasitos *Trichuris trichiura* e *Blastocystis hominis*[1,2,3]. No resultado deve constar se a técnica usada é ou não indicada para a pesquisa de ovos de *Enterobius vermicularis* (Fig. 7.1).

EXAME PARASITOLÓGICO DAS FEZES

Paciente _____ **Data** _____

Médico _____ **N.°** _____

RESULTADO

"Positivo"

Ovos de *Ascaris lumbricoides*
Larvas de *Strongyloides stercoralis*
Cistos de *Giardia lamblia*

"Negativo"

Não foram vistos ovos, larvas e cistos de parasitos.

Observação: A técnica usada não é indicada para a pesquisa de ovos de ***Enterobius vermicularis*.**

Fig. 7.1 — *Modelo de laudo para o exame parasitológico das fezes.*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Expressão dos Resultados

Exame Macroscópico

1. Vermes adultos de *Ascaris lumbricoides*.
2. Vermes adultos de *Enterobius vermicularis*.
3. Proglotes grávidas de *Taenia saginata*.
4. Sangue fresco presente no material fecal.

Observações

1. Informar a presença de helmintos adultos ou pedaços de vermes e de sangue fresco no material fecal.

2. A morfologia e o tamanho são importantes fatores para a identificação dos espécimes adultos de *E. vermicularis*, *A. lumbricoides* e proglotes de tênias.

Exame Microscópico

1. Trofozoítos de *Giardia lamblia.*
2. Cistos de *Entamoeba coli.*
3. Ovos de *Ascaris lumbricoides*.
4. Larvas de *Strongyloides stercoralis*.
5. Oocistos de *Isospora belli.*
6. Oocistos de *Cryptosporidium parvum*.
7. Moderada presença de cristas de Charcot-Leyden.
8. Regular presença de hemácias.
9. Moderada presença de neutrófilos polimorfonucleares.

Observações

1. Os artefatos e/ou outras estruturas poderão ser observadas e identificadas (os cristais e as células devem ser quantificados; entretanto, a quantificação é avaliada quando os esfregaços permanentes corados são examinados, aumento 1.000X) (Tabelas 7.1 e 7.2).

2. Quantificar o número de *Blastocystis hominis* (raros, poucos, moderados e muitos). Não quantificar os outros protozoários.

3. Anotar e quantificar a presença de células humanas.

4. Informar e quantificar as células de levedura (exemplo: moderadas células de levedura em brotamento e poucas pseudo-hifas).

5. A Tabela 7.1 pode ser usada para a quantificação de esfregaços permanentes corados, com lente de imersão (objetiva de 100X, aumento total 1.000X).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

6. Apesar de alguns autores terem mudado a espécie para *Giardia intestinalis* ou *Giardia duodenalis*, não existe, entretanto, concordância entre os parasitologistas. Por essa razão, o registro do protozoário é mantido como *Giardia lamblia*.

7. Para a quantificação de protozoários e helmintos poderá ser usada a Tabela 7.2.

ANEXO

Parasitos do Sangue, do Trato Geniturinário e Exame de Protozoários

Parasitos do Sangue

1. Trofozoítos e gametócitos de *Plasmodium falciparum*.
2. Trofozoítos, gametócitos e esquizontes de *Plasmodium vivax*.
3. Tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.
4. Amastigotas de *Leishmania donovani*.
5. Microfilárias de *Wuchereria bancrofti*.

Observações

1. Informar o gênero e a espécie da microfilária presente.
2. Quando as características morfológicas forem insuficientes para permitir a identificação do gênero e/ou da espécie, o resultado deve ser reportado como segue:

Presença de microfilária com bainha.
Presença de microfilária sem bainha.
Presença de microfilária.

Parasitos do Trato Geniturinário

Presença de *Trichomonas vaginalis*.
Não foram vistos *Trichomonas vaginalis*.

Tabela 7.1
Quantificação de Parasitos, Células Humanas, Leveduras e Artefatos[1]

Quantidade	*Número por 10 Campos com Objetiva de Imersão (100X)*
Poucos	≤ 2
Moderados	3-9
Muitos	≥ 10

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Tabela 7.2
Quantificação dos Organismos[a1]

	Quantificação	
Quantidade	*Protozoários*	*Helmintos*
Raros	2-5/pl[b]	2-5/pl[c]
Poucos	1/5-10 plga	1/5-10 plpa
Moderados	1-2/plga a ½-3 plga	1-2/plpa
Muitos	Vários/plga	Vários/plpa

[a]Essa quantificação (baseada em lamínula 22 x 22mm) é usada pelo Centers for Disease Control and Prevention Proficiency Testing Program (EUA), Microbiology-Parasitology, 1985. Abreviações: pl. = pesquisa em lamínula de 22 x 22mm; plga = pesquisa total do campo microscópico (aumento 400X); plpa = pesquisa total do campo microscópico com pequeno aumento (100X).
[b]Pesquisa total do campo microscópico com grande aumento (400X).
[c]Pesquisa total do campo microscópico com pequeno aumento (100X).

Observações: Não reportar o estágio do organismo, quando não for conhecida a forma cística, somente a trofozoítica.

Exame Cultural de Protozoários

Presença de *Entamoeba histolytica.*
Não foi isolada *Entamoeba histolytica.*
Positivo para *Trichomonas vaginalis.*
Positivo para *Leishmania* spp.
Negativo para *Leishmania* spp.
Positivo para *Trypanosoma cruzi.*
Negativo para *Trypanosoma cruzi.*

REVISÃO: FORMA CORRETA DE EXPRESSAR OS RESULTADOS

1. Todos os parasitos patogênicos ou não-patogênicos devem ser reportados nos seus nomes científicos, dando ênfase ao estágio de diagnóstico identificado.

2. Os nomes das espécies seguem a nomenclatura binária, sendo formados por um nome genérico e um nome específico. Os nomes científicos são sempre grifados, ou escritos em itálico ou em negrito.

3. Geralmente os protozoários e os helmintos não são quantificados. Entretanto, o estágio de diagnóstico específico (por exemplo: trofozoítos, cistos, oocistos, esporos, ovos e larvas) deve ser indicado.

4. Exceções quanto à quantificação seriam para o *Blastocystis hominis* (existe uma associação entre o número e os sintomas) e o *Trichuris trichiura.*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

5. Cristais de Charcot-Leyden devem ser informados e quantificados.

6. Quando os espécimes são frescos ou recentemente preservados, as leveduras devem ser mencionadas e quantificadas.

7. A *Entamoeba histolytica* é usada para designar a existência de zimodemos patogênicos, enquanto que *E. dispar* é agora usada para designar a existência de zimodemos não-patogênicos. (A tendência moderna é voltar a essa concepção dualista, revalidando o nome *E. dispar* para a espécie não-patogênica[5].)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3rd ed. Washington (DC): ASM Press, 1997.
2. Garcia LS. Pratical Guide to Diagnostic Prarasitology. Washington (DC): ASM Press, 1999.
3. Insenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, v.2, 1992.
4. Neves DP. Parasitologia Humana. 10a ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000.
5. Rey L. Dicionário de termos técnicos de Medicina e Saúde. Rio Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte



SEÇÃO 2

Exame de Aspirados, dos Tecidos, da Urina, das Secreções e de Material de Biópsia

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CAPÍTULO 8



Exame de Outros Espécimes do Trato Intestinal e Sistema Urogenital

Geraldo Attilio De Carli

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Uma variedade de procedimentos são indicados para a identificação e diagnóstico dos parasitos na região perianal (fita gomada), no intestino delgado (aspirado duodenal), no intestino grosso (sigmoidoscopia), no estômago (endoscopia) e no sistema urogenital. Entretanto, existe a possibilidade dos parasitos ocorrerem em outros locais, diferentes de seu hábitat usual.

PESQUISA DE *ENTEROBIUS VERMICULARIS*

Os vermes adultos de *E. vermicularis* vivem no ceco, cólon, apêndice e na região anal. A maioria dos autores afirmam que as fêmeas grávidas não realizam ovoposição. Os ovos são libertados pelo rompimento (ação mecânica) ou dessecação do parasito. Faust e Russell[22] relataram que os ovos são detectados nas fezes em não mais de 5% dos indivíduos infectados. Como os ovos são depositados fora do corpo, na região perianal, o diagnóstico é realizado através dos *swabs* anais. Hall[34] descreveu o *swab* anal NIH (National Institute of Health) e mostrou sua superioridade sobre os outros processos de diagnóstico. Graham[32] reportou o método da fita de celofane adesiva e transparente, o qual foi modificado por Jacobs[41] e Beaver[5] e introduzido na rotina do diagnóstico dessa parasitose por Brooke, Donaldson e Mitchell[6]. Os *swabs* anais são indicados para a

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

pesquisa na região anal e perianal de ovos de *E. vermicularis* e com menos freqüência ovos de *Taenia* spp. Os métodos usados para a identificação dos ovos de *E. vermicularis* são: o método modificado da fita de celofane adesiva e transparente[5,6,34,41], e o método do *swab* da vaselina-parafina (VASPAR)[61].

Método da Fita de Celofane Adesiva e Transparente

O método da fita de celofane adesiva e transparente de Brooke, Donaldson e Mitchell[10] foi desenvolvido para o diagnóstico de ovos de *E. vermicularis* e, eventualmente, de ovos de *Taenia* spp.

Amostra e Colheita

Os ovos são mais facilmente colhidos se o exame for realizado algumas horas após o paciente ter se deitado, ou pela manhã, antes de defecar ou banhar-se. A colheita deve ser realizada em dias consecutivos (no mínimo uma série de quatro a seis colheitas) antes que o paciente venha a ser considerado livre da infecção.

Reagentes

1. Fita de celofane adesiva e transparente (sinonímia: fita *Durex* ou *Scotch tape;* não usar fita *Magic* transparente).
2. Toluol (tolueno) (C_7H_8), ou xilol (xileno) (C_8H_{10}) ou iodo-xilol.

Preparação e Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colocar um pedaço da fita de celofane adesiva e transparente (fita gomada transparente), com 12cm de comprimento e 20mm de largura, em uma lâmina de microscopia. Colocar etiquetas (1,0 x 2,5cm) nas extremidades da fita que excedam o tamanho da lâmina (Fig. 8.1A).

3. Para obter a amostra da região perianal, retirar a fita celofane adesiva da lâmina e fazer com que esta contorne um abaixador de língua de madeira, ficando a superfície gomada voltada para fora (Fig. 8.1B).

4. Pressionar firmemente o *swab* anal contra as pregas da direita e da esquerda da região anal e perianal (Fig. 8.1C).

5. Recolocar a fita de celofane adesiva na lâmina, com a face gomada para baixo, evitando a formação de pregas ou bolhas (Fig. 8.1D, E).

6. Identificar a etiqueta com o nome do paciente, número do exame e data.

7. Levantar cuidadosamente a fita gomada e colocar uma gota de tolueno, ou xileno, ou iodo-xilol, e pressionar a fita sobre a lâmina. A preparação ficará clara ou levemente corada pelo iodo-xilol, tornando os ovos bem visíveis.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Examinar a lâmina com pequeno aumento (10X ou 15X) e com baixa intensidade luminosa.

Se os ovos não forem encontrados na área central, examinar toda a preparação antes de reportar que "não foram vistos ovos de parasitos".

Controle de Qualidade (CQ)

1. O laboratório deverá manter lâminas permanentes com ovos e vermes adultos de *E. vermicularis* para comparar a morfologia. Desenhos e fotografias do parasito deverão também estar à disposição do pessoal técnico para que possa ser estabelecida a comparação com os espécimes clínicos.

2. Participar de programas de controle de qualidade que incluam parasitos desconhecidos.

3. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

4. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[12].

Observações

1. Como os ovos são depositados fora do corpo, esporadicamente na região perianal, o diagnóstico é realizado através dos *swabs* anais.

2. Os ovos do *E. vermicularis* são parcialmente embrionados quando depositados, completando rapidamente o seu desenvolvimento para larvas infectantes de primeiro estádio em quatro a seis horas. Freqüentemente, no momento da colheita pela fita de celofane adesiva e transparente os ovos estão completamente embrionados.

3. Quando as fêmeas libertam seus ovos no ceco ou no apêndice, eles são encontrados na superfície da massa fecal. Quando um exame direto a fresco for preparado com fezes dessa área, um grande número de ovos poderá ser encontrado nesse local específico, o que não ocorre em outras áreas do bolo fecal. Por essa razão, esfregaços a fresco e, igualmente, técnicas de concentração não são recomendados para o diagnóstico de rotina da enterobíase.

4. Sem a colheita de múltiplos esfregaços perianais (colhidos consecutivamente a cada manhã) não é possível determinar se o paciente é positivo ou negativo para a infecção.

5. Ocasionalmente, familiares trazem para a identificação um verme adulto colhido da região perianal ou da superfície das fezes. A identificação do verme adulto (quase sempre uma fêmea) confirma a infecção.

6. Quando as preparações forem estocadas antes do exame, não adicionar tolueno ou xileno até o momento da pesquisa, pois um contato prolongado com os reagentes poderá causar uma degeneração dos organismos. Antes

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

do exame as lâminas poderão ser armazenadas no refrigerador, por vários dias ou semanas, sem degradação dos ovos.

7. Através desse método, além dos ovos típicos, podem ser vistos uma ou duas fêmeas de *Enterobius* e, eventualmente, ovos de *Taenia* spp. (Fig.8.1).

8. Antes de considerar o paciente livre de infecção deverão ser realizados quatro ou seis exames em dias consecutivos. Os adultos colhidos da região perianal ou da superfície das fezes confirmam a infecção.

9. Quando os ovos não forem encontrados na área central, examinar toda a preparação antes de reportar que "não foram vistos ovos ou adultos do parasito".

10. Quando a fita de celofane adesiva e transparente estiver opaca e foi usada para a colheita, colocar uma gota do óleo de inversão sobre ela, ficando a fita suficientemente clara para prosseguir o exame microscópico.

11. A lâmina de microscopia com a fita de celofane adesiva e transparente com ovos infectantes deve ser transportada com cuidado, desde que

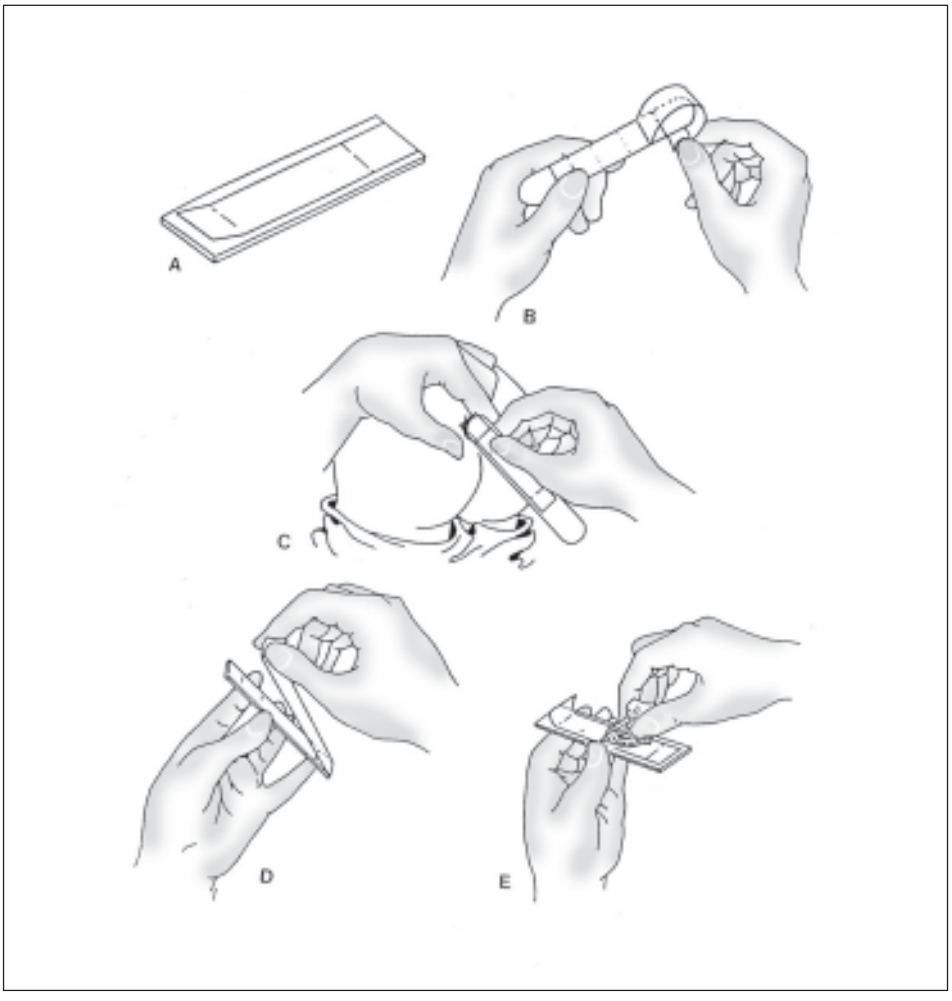


Fig. 8.1 — *Método da fita de celofane adesiva e transparente para a colheita de ovos de* Enterobius vermicularis. *(Adaptada de Ash LR, Oriehl TC. Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. Chicago (Ill): ASCP Press, 1991.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

esses espécimes representam uma fonte em potencial de infecção[2,12,29,30,61,64].

Método do *Swab* de Vaselina e Parafina (VASPAR)

O método do VASPAR foi desenvolvido por Markey[61] para o diagnóstico de ovos de *Enterobius vermicularis* e, eventualmente, ovos de *Taenia* spp.

Amostra e Colheita

Os ovos são mais facilmente colhidos se o exame for realizado algumas horas após o paciente ter se deitado, ou, pela manhã, antes de defecar ou banhar-se.

Reagentes

1. Parafina líquida
2. Vaselina líquida
3. Xilol (xileno) (C_8H_{10})

Preparação e Método

1. Mergulhar o *swab* de algodão em mistura de quatro partes de vaselina e uma parte de parafina (4:1).

2. Colocar o *swab* de algodão revestido com a camada de vaselina-parafina em tubo de ensaio (13 x 100mm) fechado com uma bucha de algodão. Armazenar no refrigerador (3-5°C).

3. Esfregar sutilmente o *swab* na superfície perianal e introduzir pequena porção no orifício anal.

4. Repor o *swab* no tubo.

5. Encher 1/3 do tubo com xilol ou com quantidade suficiente para cobrir o *swab*. Deixar em repouso por cinco minutos.

6. Remover o *swab* e centrifugar (500 x *g*/1min).

7. Com pipeta capilar, colher o sobrenadante. Transferir várias gotas para uma lâmina de microscopia. Não é necessário cobrir a preparação com lamínula. Para evitar a expansão do material em uma grande área, colocar as gotas no centro de um anel desenhado com lápis de cera e examinar imediatamente. O anel pode ser dissolvido com o xilol.

Controle de Qualidade (CQ)

1. O laboratório deverá manter lâminas permanentes com ovos e vermes adultos de *E. vermicularis* para comparar a morfologia. Desenhos e fotografias do parasito deverão também estar à disposição do pessoal téc-

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

nico para que possa ser estabelecida a comparação com os espécimes clínicos.

2. Participar de programas de controle de qualidade que incluam parasitos desconhecidos.

3. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

4. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[12].

Observações

1. As fêmeas do *E. vermicularis* depositam esporadicamente os ovos na região perianal.

2. Sem a colheita de múltiplos esfregaços perianais (colhidos, consecutivamente, a cada manhã) não é possível determinar se o paciente é positivo ou negativo para a infecção.

3. Ocasionalmente, familiares trazem para a identificação um adulto colhido da região perianal ou da superfície das fezes.

4. A identificação do verme adulto (quase sempre uma fêmea) confirma a infecção. Os ovos do *E. vermicularis* são usualmente infectantes.

5. O *swab* de vaselina e parafina (VASPAR) é uma alternativa de segurança.

ASPIRADO DUODENAL

O estudo do líquido duodenal é um procedimento que revela com freqüência organismos, mesmo quando o exame parasitológico das fezes é negativo. Por essa razão, quando um diagnóstico não pode ser estabelecido pelo exame fecal, deverá ser colhido o material de drenagem duodenal. Estudos comparativos de várias técnicas usadas para o diagnóstico da giardíase mostraram que o exame do fluido duodenal é mais seguro do que o exame das fezes no diagnóstico dessa infecção. O conteúdo duodenal deverá ser estudado nos casos suspeitos, quando o parasito não é encontrado nas fezes, depois de um razoável número de exames coprológicos. Um número maior de casos é detectado quando são combinados os resultados de um aspirado duodenal e os de múltiplos exames das fezes. A *G. lamblia* pode ocasionalmente ser encontrada nas fezes, quando não é diagnosticada no aspirado duodenal. Este fato enfatiza o ponto de que o exame do fluido duodenal poderá complementar, mas não substituir, o exame das fezes. A centrifugação do líquido duodenal aumenta a sensibilidade do exame[2,29,30].

Método da Cápsula Duodenal (*Entero Test*®)

Diagnóstico de larvas de *Strongyloides stercoralis*, trofozoítos de *Giardia lamblia*, oocistos de *Isospora belli* e *Cryptosporidium parvum*,

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

ovos de *Fasciola hepatica* e, raramente, ovos de *Clonorchis sinensis* e *Opisthorchis viverrini*.

A técnica da cápsula duodenal (*Entero Test*®)[4,83], produzida pela Health Development Corporation, 2411 Pulgas Avenue, Palo Alto, Califórnia, EUA, é um novo procedimento para a colheita do conteúdo duodenal com o máximo de simplicidade e o mínimo de desconforto para o paciente. Diversos autores[4,30,50] mostraram que esse método é comparável em eficiência com à intubação duodenal para a recuperação dos trofozoítos de *G. lamblia*. Esse dispositivo consiste de um fio de náilon, com 140cm de comprimento para adultos e 90cm para crianças, unido a uma esfera de metal com 1g de peso, embebida em borracha de silicone. O fio fica enrolado dentro de uma cápsula de gelatina (número 00) revestida com borracha de silicone, tendo uma das extremidades livre (Fig. 8.2). A ponta livre do fio é fixada com esparadrapo no rosto do paciente. A cápsula é administrada via oral, com o paciente em jejum. A gelatina se dissolve no estômago e o fio, com o peso, chega por peristalse ao duodeno. Em mais de 90% dos casos relatados, a linha fica completamente distendida em quatro horas. Após, o fio é gentilmente retirado pela ponta livre. Usualmente, a metade da parte distal da linha é saturada com muco corado com bile. Normalmente, são obtidas quatro a cinco gotas de material duodenal. A amostra deve ser examinada imediatamente pelo exame direto a fresco para a pesquisa de organismos móveis. A solução de iodo deverá ser adicionada à preparação, para facilitar a identificação dos parasitos, ou preservada em solução de formaldeído a 5% ou 10%. O pH da extremidade distal deve ser controlado para garantir a passagem ao duodeno. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento. Os espécimes são examinados pelo exame direto a fresco ou através de preparações permanentes coradas[4,14,28,29,50,80,88].

Reagentes

1. Fixador de Schaudinn (ver p. 11)
2. Fixador álcool polivinílico (fixador-APV) (ver p. 14)
3. Solução de formaldeído a 10% (ver p. 9)

Colheita da Amostra

1. O médico deve informar ao laboratório quando a cápsula foi engolida pelo paciente. O fio de náilon fica completamente distendido em quatro horas. Após, o fio é gentilmente retirado pela ponta livre, sendo cuidadosamente colocado em um recipiente seguro com tampa e transportado em um saco de plástico. Não usar placa de Petri porque a tampa não é atarraxada.

2. O espécime deve ser transportado imediatamente ao laboratório e examinado dentro de uma hora.

3. Para manter a linha úmida, caso haja atraso no transporte do material ao laboratório, adicionar pequena quantidade de solução salina fisiológica.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Procedimento

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Registrar a cor do fio. A coloração amarela da bile indica que a linha atingiu o duodeno.

3. Colher todo o muco aderido à linha em um tubo com tampa de rosca (*screw-capped*), comprimindo o fio do meio até o fim com leve pressão entre as pontas de uma pinça.

4. Usualmente a metade da parte distal da linha é saturada com muco corado com bile. Normalmente, são obtidas quatro a cinco gotas de material duodenal.

5. Colocar uma gota do muco entre lâmina e lamínula (22 x 22mm).

6. Adicionar uma gota da solução salina a 0,85% caso o muco esteja muito viscoso. Para a pesquisa de larvas ou de trofozoítos móveis, examinar toda a preparação com aumento de 100X, observando cuidadosamente o muco onde a *G. lamblia* pode estar enredada.

7. Quando houver suficiente material, preparar esfregaço permanente corado, mergulhando a preparação no fixador de Schaudinn. Caso esse procedimento não seja possível, colocar a lâmina do exame direto a fresco diretamente no fixador de Schaudinn depositado na cuba de *Coplin*. A lamínula flutuará, depositando-se na superfície do fixador. Após a fixação, preparar um esfregaço permanente corado. Os tempos de fixação e de coloração são idênticos aos usados para as amostras fecais (ver Capítulo 3).

8. Examinar o muco com grande aumento, já que a *G. lamblia* é mais facilmente detectada pela agitação dos flagelos do que pela mobilidade.

9. Quando o material contém muito muco ou é líquido, misturar diretamente na lâmina uma ou duas gotas da amostra com três a quatro gotas do fixador APV. Antes da coloração, deixar o esfregaço secar à temperatura ambiente por duas horas. Os tempos de fixação e coloração são idênticos aos usados para as amostras fecais (ver Capítulo 3).

10. Para a pesquisa de *C. parvum* e *I. belli* preparar várias lâminas com gotas do muco, corando após os esfregaços com um dos corantes derivados de Ziehl-Neelsen.

11. Examinar as preparações permanentes coradas com objetivas de imersão (97 a 100X), com o máximo de intensidade luminosa.

12. Quando larvas de *Strongyloides* estiverem presentes, preservar o restante do material em solução de formaldeído a 10%, para propósitos de ensino e de treinamento[14,29,30,61].

Controle de Qualidade (CQ)

1. Verificar o CQ do líquido de Schaudinn, fixador APV e solução de formaldeído a 10%.

2. Controlar semanalmente os preservadores ou quando for usado um novo número de lote dos reagentes. Os preservadores devem estar claros

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

sem contaminação visível. Para testar a eficácia dos preservadores, usar fezes frescas positivas para protozoários ou negativas para parasitos misturados com leucócitos. Cultura de protozoários também pode ser empregada no CQ.

3. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

4. *Slides* coloridos, fotografias e livros de referência devem estar à disposição no laboratório de Parasitologia.

5. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[14].

Observações

1. Muitos organismos são identificados no muco; por essa razão, é de extrema importância examinar o espécime com grande aumento (400X) e com baixa intensidade luminosa, para que a agitação dos flagelos da *G. lamblia* possa ser identificada.

2. Quando o material colhido do duodeno, através da cápsula *Entero Test*® é normalmente examinado em preparações a fresco, alguns organismos (*C. parvum* e *I. belli*) não são identificados sem a preparação de esfregaços permanentes corados (Fig. 8.2).

3. As colorações do tricrômico e da hematoxilina férrica são usadas para a identificação de trofozoítos de protozoários.

4. Os oocistos não apresentam bons resultados na identificação com os corantes de rotina. Usar colorações adicionais quando um organismo suspeito



Fig. 8.2 — *Cápsula duodenal Entero Test® para a colheita do conteúdo duodenal (Segundo Burke JA. The clinical and laboratory diagnosis of giardiasis. CRC Cr Rev Clin Lab Sci, 7:373-391, 1977).*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

é observado. Os oocistos de *C. parvum* e *I. belli* são identificados através de esfregaços permanentes corados pelos derivados de Ziehl-Neelsen (ver Capítulo 10).

5. Os ovos e larvas de helmintos não são facilmente identificados nos esfregaços permanentes corados, mas são visíveis pelo exame direto a fresco.

6. Quando os resultados são negativos através do exame direto a fresco, realizado antes do exame dos esfregaços permanentes corados, o relatório enviado ao médico é considerado preliminar (baseado somente no exame direto).

7. Quantificar os ovos do *C. sinensis* quando o organismo for eventualmente identificado. Os protozoários, em geral, não são quantificados no relatório enviado pelo laboratório ao médico (exceção: *Blastocystis hominis*); entretanto, as células humanas, as células de levedura e os artefatos, como cristais de Charcot-Leyden, são normalmente informados e quantificados[14,29,30].

SIGMOIDOSCOPIA

O material obtido pela sigmoidoscopia trouxe a oportunidade de diagnosticar e monitorar o curso da amebíase e da esquistossomose por *Schistosoma mansoni.* Quando o exame das fezes é negativo para casos suspeitos de amebíase, as amostras poderão ser obtidas do intestino pela retossigmoidoscopia. Entretanto, a sigmoidoscopia não substitui o exame parasitológico das fezes. Todo paciente, antes de ser submetido a essa conduta, deverá realizar no mínimo três exames de fezes para a confirmação do diagnóstico. No mínimo seis áreas da mucosa deverão ser colhidas e examinadas. As amostras deverão ser processadas ou fixadas imediatamente após a colheita. Os procedimentos indicados para o diagnóstico são: a) exame direto a fresco; b) coloração pela hematoxilina férrica ou tricrômico e c) imunofluorescência direta (monoclonais) (IFD) ou enzima imunoensaio (EIE). As principais vantagens da biópsia da mucosa retal para o diagnóstico da esquistossomose por *Schistosoma mansoni* são: a) maior sensibilidade do método; b) capacidade de determinar a viabilidade dos ovos pela observação dos movimentos das larvas e c) verificação rápida do efeito da quimioterapia[29,30,60].

Material de Sigmoidoscopia: Exame Direto a Fresco

Diagnóstico de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* e ovos de *Schistosoma mansoni.*

O primeiro exame das amostras deve ser feito por meio de esfregaços salinos. O exame direto a fresco é usado para diagnosticar parasitos móveis que vivem no cólon (*E. histolytica*). As amostras devem ser colhidas de áreas específicas com ulcerações e, na ausência de lesões específicas, colher da mucosa ao acaso. Examinar o esfregaço com pequeno aumento (100X) para a presença de trofozoítos móveis e/ou células humanas. Com grande

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

aumento (400X) os organismos são identificados pelo tamanho, número e estrutura do núcleo, pela aparência do citoplasma e motilidade (somente nas preparações salinas). A solução salina a 0,85% apresenta resultados satisfatórios na preparação de esfregaços, os quais são considerados preliminares. Os organismos nunca devem ser identificados tomando como referência somente uma preparação direta a fresco; esfregaços com coloração permanente deverão ser examinados para que seja estabelecida a caracterização morfológica e a identificação específica do organismo em estudo[26,30,60,64].

Amostra e Colheita

Os espécimes colhidos são: o revestimento da mucosa, o muco, as fezes e/ou a combinação dos três. As amostras devem ser colhidas pelo médico. O exame imediato é realizado no quarto do paciente e/ou enviado ao laboratório para subseqüente exame. A preparação da montagem salina depende do tipo do espécime. Quando o material é transportado ao laboratório, adicionar ao espécime uma pequena quantidade de solução salina fisiológica (0,5 a 1,0ml) para impedir que a amostra desidrate e seque. Os espécimes devem ser transportados imediatamente ao laboratório após a colheita, dentro de um período de 30 minutos. Quando os critérios indicados para a colheita não puderem ser observados, as amostras deverão ser preservadas e esfregaços permanentes corados deverão ser preparados e examinados[26].

Reagentes

1. Solução salina a 0,85% (ver p. 35)
2. Solução de iodo de Lugol ou de D'Antoni (ver p. 39)

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colocar uma ou duas gotas de solução salina a 0,85% em uma extremidade da lâmina de microscopia e uma gota de solução de iodo (Lugol ou D'Antoni) na outra extremidade.

3. Uma ou duas gotas do espécime é misturada na salina e na solução de iodo. Cobrir a preparação com uma lamínula (22 x 22mm). A quantidade da salina será determinada pelo espécime (menos salina se o material é muito líquido).

4. Examinar a preparação com objetiva de pequeno aumento (10X) e com pequena intensidade luminosa. Esfregaços com coloração permanente devem ser examinados para confirmar o diagnóstico preliminar[27].

Controle de Qualidade (CQ)

1. As soluções salina e de iodo devem ser controladas diariamente no momento do uso. A solução salina deve estar clara, sem contaminação por

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

bactérias e fungos. A solução de iodo deve conservar a cor castanho-escuro (chá-da-índia ou vinho do Porto), apresentando uma correta intensidade de contraste. Desprezar as soluções fracas.

2. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

3. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[27].

Observações

Várias áreas da mucosa devem ser examinadas; é recomendada a preparação de seis esfregaços. Este método não é indicado como exame de rotina para a pesquisa de cistos de protozoários e ovos de helmintos.

Material de Sigmoidoscopia: Esfregaços Permanentes Corados

Diagnóstico de trofozoítos e/ou cistos de *Entamoeba histolytica* e ovos de *Schistosoma mansoni*, ovos e larvas de helmintos e oocistos de coccídios.

As colorações permanentes são usadas para a identificação de trofozoítos, ocasionalmente de cistos e para confirmação das espécies. Essas preparações são indicadas para diagnosticar parasitos que vivem no cólon (*E. histolytica*). Colher amostras de áreas específicas com ulcerações; na ausência de lesões específicas, colher amostras da mucosa ao acaso. Através do exame de esfregaços permanentes corados (1.000X) são detectados trofozoítos e/ou cistos de protozoários, oocistos de coccídios, ovos e larvas de helmintos, e/ou células humanas. Os esfregaços para a pesquisa de protozoários são corados pela hematoxilina férrica ou pelo tricrômico, enquanto os coccídios, pelas colorações derivadas de Ziehl-Neelsen. Esfregaços permanentes corados deverão ser examinados para que seja estabelecida a caracterização morfológica e a identificação específica do organismo em estudo[27,30].

Amostra e Colheita

Os espécimes colhidos são: o revestimento da mucosa, o muco, as fezes e/ou a combinação dos três. As amostras são colhidas pelo médico. Quando o material é transportado ao laboratório adicionar ao espécime uma pequena quantidade de solução salina fisiológica (0,5 a 1,0ml) para impedir que a amostra desidrate e seque. Os espécimes devem ser transportados imediatamente após a colheita ao laboratório, dentro de um período de 30 minutos. Quando os critérios indicados para a colheita não puderem ser observados, as amostras deverão ser preservadas e esfregaços permanentes corados deverão ser preparados e examinados[27,30].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Reagentes

1. Fixador de Schaudinn (ver p. 11)
2. Fixador álcool polivinílico (Fixador-APV) (ver p. 14)

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Quando o espécime não contém sangue e/ou muco ou não está úmido, estirar gentilmente uma ou duas gotas do material do paciente sobre uma lâmina de microscopia e mergulhar, imediatamente após, durante 30 minutos no fixador de Schaudinn. Terminada a fixação, os esfregaços estão prontos para serem corados, montados e examinados (ver colorações pela hematoxilina férrica e pelo tricrômico).

3. Quando o espécime contém sangue e muco e não está úmido, colocar três a quatro gotas do fixador APV em uma lâmina de microscopia e misturar uma ou duas gotas do material colhido do paciente com o fixador. Preparar um esfregaço fino, estirando a mistura sobre um terço da superfície da lâmina e depois colocá-lo na posição horizontal para secar à temperatura ambiente (duas horas). Terminada a fixação, os esfregaços estão prontos para serem corados, montados e examinados (ver colorações pela hematoxilina férrica e pelo tricrômico).

4. Examinar no mínimo 300 campos dos esfregaços corados, com objetiva de imersão (97 a 100X) e com o máximo de intensidade luminosa.

Controle de Qualidade (CQ)

1. Controlar semanalmente os preservadores ou quando for usado um novo lote dos reagentes. A eficácia dos preservadores é determinada pelo uso de fezes frescas positivas para protozoários, ou negativas, na qual foram adicionados leucócitos humanos. Culturas de protozoários podem também ser usadas.

2. O fixador de Schaudinn deve estar claro e límpido, sem a flutuação de detritos ou cristais. O fixador pode ser usado quando alguns cristais precipitam no fundo da cuba de *Coplin.*

3. O fixador APV deve estar claro e límpido. O fixador pode ser usado quando alguns cristais precipitarem no fundo da cuba de *Coplin*.

4. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

5. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[27].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Observações

1. Os espécimes colhidos pela sigmoidoscopia são indicados para auxiliar na diferenciação entre uma doença inflamatória do intestino e a amebíase.

2. Os espécimes devem ser corados imediatamente após a colheita, para preservar a morfologia e impedir a desintegração dos trofozoítos das amebas e a distorção das células humanas.

3. As fezes do paciente deverão ser submetidas ao exame parasitológico de rotina. Colher, em dias separados, uma série de três espécimes em não mais de 10 dias ou uma série de seis amostras fecais[28,29,30].

ENDOSCOPIA

Diagnóstico de larvas de *Anisakis* spp. e de *Phocanema decipiens*.

O correto diagnóstico e o tratamento da anisaquíase gástrica têm sido facilitados pela gastrofibroscopia, como, também, pelos progressos das técnicas em medicina eletrônica. O aumento do número de infecções humanas está diretamente relacionado com a ingestão de peixe cru (*sashimi*, *sushi*, salada do Tahiti, *seviche*, *herring* verde e outros pratos preparados com peixe cru). Os organismos causadores dessa infecção são os estádios larvais dos gêneros *Anisakis*, *Phocanema* e provavelmente outros parasitos. O exame endoscópico fornece um diagnóstico definitivo da anisaquíase gástrica[40,86]. O diagnóstico imunológico é de extrema importância para a identificação clínica dessa parasitose. Inúmeros procedimentos sorológicos são usados para o diagnóstico da anisaquíase gástrica, como a imunodifusão (Ouchterlony), a imunoeletroforese (IEF), a imunofluorescência (RIF), a reação de fixação do complemento (RFC), a hemaglutinação indireta (HA) e o ELISA. Os resultados positivos dos testes sorológicos mostram que a anisaquíase está diretamente relacionada com a sobrevivência dos vermes no paciente. A endoscopia é recomendada para demonstrar o nematóide mergulhado na parede do estômago. Esse parasito pode ser removido sem a cirurgia. Nessa helmintíase os ovos são facilmente detectados pelo exame parasitológico das fezes[40,86].

SISTEMA UROGENITAL

Diagnóstico de ovos de *Schistosoma haematobium*, trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*, microfilárias de *Onchocerca volvulus* e *Wuchereria bancrofti*.

Secreção Urogenital: O *T. vaginalis* é diagnosticado na secreção urogenital do homem e da mulher. No homem deve ser examinado também o material uretral, o sêmen, o sedimento centrifugado da urina matinal, a secreção prostática e o material subprepucial. Na mulher, o material é usu-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

almente colhido na vagina e quando houver sinais clínicos deverão ser examinados a uretra, as grandes glândulas vestibulares (ou glândulas de Bartholin) e as parauretrais[28,39,42,45,54,64].

Urina: Ovos e larvas de helmintos e alguns protozoários que infectam o homem são eventualmente diagnosticados na urina, podendo ou não produzir seqüelas patológicas no trato urinário. O exame do sedimento urinário é indicado para o diagnóstico de infecções causadas pelo *T. vaginalis*, *S. haematobium* e da *O. volvulus*[2,24,48,49].

Técnica da Tríplice Concentração da Urina

Reagentes e Material

1. Timerosal ($C_9H_9HgO_2SNa$).
2. Funil de Baermann de vidro ou de plástico de 10 a 12cm de diâmetro, tendo a haste ligada a um tubo de látex (5 a 10cm de comprimento) fechado com uma pinça de Mohr (Fig. 4.1a).

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Coletar a urina e marcar o volume. Adicionar 1ml de timerosal para cada 100ml de urina.

3. Encher o funil, ligado a um tubo de látex fechado com uma pinça de Mohr, com a urina.

4. Deixar a preparação em repouso durante toda a noite.

5. Abrir a pinça e coletar 20 a 30ml da urina e centrifugar (400 x *g*/3 a 5min).

6. Desprezar o sobrenadante e examinar o sedimento, ao microscópio, entre lâmina e lamínula para a presença de microfilárias[2].

Técnica da Urina Concentrada pela Centrifugação

Diagnóstico de trofozoítos de *T. vaginalis*, ovos de *S. haematobium* e microfilárias.

Ovos e larvas de helmintos e alguns protozoários que infectam o homem são eventualmente diagnosticados na urina, podendo ou não produzir seqüelas patológicas no trato urinário. O exame do sedimento urinário é indicado para o diagnóstico de infecções causadas pelo *T. vaginalis*, *S. haematobium*[72] e de certas filárias. As microfilárias são diagnosticadas na urina de pacientes com quilúria, com infecções maciças ou recentemente tratados com dietilcarbamazina (DEC).

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Colheita da Amostra

1. *T. vaginalis*

O diagnóstico é realizado na urina recente, preferentemente na primeira micção matinal. A urina deve ser enviada ao laboratório imediatamente após a colheita. O *T. vaginalis* perde sua mobilidade característica quando a urina permanece em temperatura ambiente fria ou de refrigerador. O organismo torna-se redondo, imóvel e eventualmente morre. Quando o paciente é portador de infecção intestinal pelo *Trichomonas hominis* e a amostra urogenital foi contaminada com material fecal, um resultado falso-positivo pode ser relatado porque o *T. vaginalis* e o *T. hominis* são semelhantes quanto à forma (piriforme, ovóide ou elipsóide[30,39,42] (ver Capítulo 25).

2. *S. haematobium*

Os ovos de *S. haematobium* são detectados com maior freqüência na urina colhida após o meio-dia, do que nas primeiras porções matinais. Quando é colhida urina de 24 horas, não usar preservadores. Rejeitar toda a urina de 24 horas que tiver mais de 48 horas de estocagem. O pico da ovoposição ocorre entre o meio-dia e as 15 horas. Nas amostras com sangue e pus, os ovos são observados com maior intensidade na porção terminal da micção. Sendo a passagem dos ovos do esquistossomo intermitente, as colheitas das amostras devem ser realizadas durante três dias consecutivos. Clinicamente é importante determinar a viabilidade dos ovos. O sedimento urinário deve ser examinado para a pesquisa de ovos em preparações diretas a fresco (aumento de 400X). Ovos de *S. mansoni* e *S. japonicum* são eventualmente identificados na urina. A morfologia desses ovos deve ser examinada com cuidado para estabelecer a identificação morfológica das espécies[2,30,60,64].

3. Filárias

As microfilárias são diagnosticadas na urina de pacientes com quilúria, com infecções maciças ou recentemente tratadas com dietilcarbamazina (DEC). As microfilárias são identificadas através de esfregaços corados (sedimento urinário). Quando é colhida urina de 24 horas, não usar preservadores. Rejeitar toda a urina de 24 horas que tiver mais de 48 horas de estocagem. Quando as microfilárias são diagnosticadas, a identificação das espécies é realizada através de esfregaços sangüíneos espessos corados[2,30,60,64] (ver Capítulos 18 e 19).

Reagente

1. Solução salina a 0,85% (ver p. 35)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Controle de Qualidade (CQ)

1. Verificar os reagentes sempre que forem usados. A solução salina deve apresentar aparência clara sem contaminação visível.

2. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

3. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[9].

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Quando é colhida urina de 24 horas, deixar a amostra sedimentar em copo cônico durante duas horas. Decantar com cuidado o sobrenadante. Aproximadamente 10 a 20ml de sedimento são depositados. Quando é recebida a urina da primeira micção matinal, usar toda a amostra.

3. Colocar o sedimento urinário em um tubo de centrífuga.

4. Centrifugar (500 x *g*/5min).

5. Decantar o sobrenadante.

6. Com uma longa pipeta capilar, fixada a um bulbo de borracha, misturar e colher uma pequena porção do sedimento.

7. Colocar uma ou duas gotas do sedimento em uma lâmina de microscopia, cobrindo a preparação com uma lamínula.

8. Examinar ao microscópico com aumentos de 100X e 400X[2,9].

Observações

Quando a urina é microscopicamente examinada, confirmar se não houve contaminação fecal pela presença de artefatos, fragmentos de vegetais etc. Esse tipo de contaminação é raro, provavelmente está limitado às amostras de urina.

Técnica da Urina Concentrada pela Membrana Filtrante (*Nuclepore*®)

As microfilárias são diagnosticadas na urina de pacientes com infecções maciças ou em pacientes recentemente tratados com dietilcarbamazina (DEC). Os ovos de *S. haematobium* também são diagnosticados na urina. As microfilárias e os ovos de *S. haematobium* são facilmente recuperados pela passagem da urina através de uma membrana filtrante, e observados pela microscopia óptica[2,10,30,68] (ver Capítulos18 e 19).

Diagnóstico de Ovos de *S. haematobium* e microfilárias.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

1. *S. haematobium*

Os ovos de *S. haematobium* são detectados com maior freqüência na urina colhida após o meio-dia, do que nas primeiras porções matinais. Quando é colhida urina de 24 horas, não usar preservadores. O pico da ovoposição ocorre entre o meio-dia e as 15 horas. Nas amostras com sangue e pus, os ovos são observados com maior intensidade na porção terminal da micção. Sendo a passagem dos ovos do *Schistosoma* intermitente, as colheitas das amostras devem ser realizadas durante três dias consecutivos.

2. Filárias

As microfilárias são diagnosticadas na urina de pacientes com quilúria, com infecções maciças ou recentemente tratados com dietilcarbamazina (DEC). Quando é colhida urina matinal ou de 24 horas, não usar preservadores.

Reagentes e Materiais

1. Solução salina a 0,85% (ver p. 35)
2. Corantes: Giemsa (ver p. 821), hematoxilina de Delafield (ver p. 396) ou hematoxilina de Harris (ver p. 402)
3. Álcool metílico absoluto (CH_4O), livre de acetona
4. Álcool etílico absoluto (C_2H_6O)
5. Hematoxilina, forma cristalina (CI 75290) ($C_{16}H_{14}O_6$)
6. Tolueno (C_7H_8)
7. Sulfato de alumínio e potássio (alúmen potássico) [$KAl(SO_4)_2.12H_2O$]
8. Óxido de mercúrio II (HgO)
9. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
10. Seringa plástica de 10ml
11. Agulha calibre 25 (0,5 x 16mm)
12. Seringa plástica de 10ml
13. Filtro *Nuclepore*® ou *Millipore*® com 25mm de diâmetro e 8mm, 5mm e 3mm de porosidade
14. Porta-filtro com adaptador para seringa (s*winney filter adapter*)
15. Resina sintética (*Cytoseal 60*).

Hematoxilina de Harris, segundo Mallory[57]

Preparação do Corante

Hematoxilina, forma cristalina	1g
Álcool etílico absoluto	10ml
Sulfato de alumínio e potássio (alúmen potássico)	20g

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Água destilada-deionizada	200ml
Óxido de mercúrio II	0,5g
Ácido acético glacial	3-4 gotas

• Misturar os componentes com cuidado, a reação pode ser explosiva. Dissolver a hematoxilina no álcool etílico e o alúmen potássico na água. Aquecer até a ebulição. Adicionar a solução de hematoxilina e aquecer a ebulição por 30 segundos. Adicionar o óxido de mercúrio. Esfriar rapidamente. Acrescentar 3-4 gotas de ácido acético. Armazenar em frasco âmbar com tampa esmerilhada durante um a dois meses.

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Quando é usada urina colhida após o meio-dia, iniciar na etapa 3.

3. Para urina de 24 horas colhida para o diagnóstico de *S. haematobium* deixar a amostra sedimentar em copo cônico durante duas horas. Decantar com cuidado o sobrenadante. Aproximadamente 10 a 20ml de sedimento são depositados. Quando é recebida a urina da primeira micção matinal, usar toda a amostra.

4. Misturar completamente a urina.

5. Transferir 10ml de urina para uma seringa. Quando a urina for turva, usar menos de 10ml da amostra.

6. Colocar a membrana filtrante *Nuclepore*® ou *Millipore*® de 25mm de diâmetro no porta-filtro, com adaptador para seringa e agulha. Usar membrana filtrante de 8μm de porosidade para *S. haematobium*; 5μm para *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* e *Loa loa* e 3μm para as espécies de *Mansonella*.

7. Forçar, com cuidado, a passagem da urina através da membrana, usando pressão regular e contínua.

8. Lavar a membrana filtrante três vezes, pela passagem de 10ml de solução salina a 0,85%.

9. Repetir a etapa 6, mas encher a seringa com ar em lugar da solução salina a 0,85%. Forçar com cuidado a passagem do ar através da membrana.

10. Remover o adaptador da seringa e retirar a membrana filtrante do adaptador com uma pinça, colocando-a sobre lâmina de microscopia.

11. Adicionar com pipeta de Pasteur uma gota de solução salina a 0,85% sobre o filtro.

12. Examinar o filtro para pesquisa de microfilárias vivas e ovos com o aumento de 100X.

13. Imergir a membrana no corante de Giemsa, ou na hematoxilina de Delafield (ver p. 396) ou na hematoxilina de Harris (ver p. 402). A membrana pode ser corada como os esfregaços sangüíneos estirados.

14. Deixar a membrana secar e montar em resina sintética[10].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Controle de Qualidade (CQ)

1. Verificar os reagentes sempre que forem usados. A solução salina deve apresentar aparência clara sem nenhuma contaminação visível.

2. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

3. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[10].

Observações

1. A identificação das espécies das microfilárias é realizada pela preparação de esfregaços permanentes corados. Ash e Orihel[2] mergulham a membrana filtrante na hematoxina de Harris[57] durante cinco a 10 minutos lavando-a após em água corrente.

2. Usar o teste da eclosão de ovos para determinar a viabilidade dos ovos de *Schistosoma*. Eventualmente, ovos de outros *Schistosoma* podem ser identificados na urina.

PESQUISA DE *TRICHOMONAS VAGINALIS*

As quatro espécies de tricomonas encontradas no homem são *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax*, *Trichomonas hominis* e *Trichomitus fecalis*. A espécie *T. vaginalis*, patogênica, foi descrita pela primeira vez, em 1836, por Donné[21], que a isolou de uma mulher com vaginite. Marchand, em 1894 (58), e, independentemente, Miura[65] e Dock[20] observaram esse flagelado na uretrite de um homem. O *T. tenax*, comensal, vive na cavidade bucal humana, e também de chimpanzés e macacos. O *T. hominis*, comensal, habita o trato intestinal humano. O *T. fecalis* foi encontrado em uma única pessoa, não existindo certeza se o homem seria seu hospedeiro primário[31,37,46]. O *T. vaginalis* é diagnosticado na secreção urogenital do homem e da mulher.

O *T. vaginalis* é um dos patógenos mais freqüentemente encontrados nas doenças sexualmente transmissíveis. Estima-se que 3 milhões de mulheres nos EUA e 180 milhões no mundo são infectadas anualmente[37,39], o que corresponde a 1/3 de todas as vaginites diagnosticadas. Apesar de ter sido a doença caracterizada e o protozoário descrito em 1836 por Donné, o diagnóstico clínico e laboratorial da tricomoníase, especialmente no homem, continua apresentando inúmeras dificuldades[31,46]. Um diagnóstico clínico diferencial dessa doença, tanto no homem como na mulher, dificilmente poderá ser realizado através de sintomas e sinais específicos. A investigação laboratorial é essencial na diagnose dessa patogenia, permitindo, também, diferenciar a tricomoníase de outras doenças sexualmente transmissíveis. O tratamento da tricomoníase é es-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

pecífico e eficiente. Por isso, torna-se importante a identificação e o tratamento das pessoas infectadas, evitando assim a transmissão sexual do parasito.

Amostra

Homem

Secreção uretral, primeira urina matinal (sedimento centrifugado da urina matinal), secreção prostática, sêmen, raspado da mucosa uretral e lavado prepucial (material subprepucial).

Mulher

Secreção vaginal e primeira urina matinal. Quando houver sinais clínicos deverão ser examinadas a uretra, as grandes glândulas vestibulares e as parauretrais.

Colheita da Amostra

Homem

Para que os procedimentos de diagnóstico tenham sucesso, os homens deverão comparecer ao local da colheita, pela manhã, sem terem urinado no dia e nem tomado qualquer medicamento tricomonicida há mais de 15 dias. O material uretral é colhido com uma alça de platina (Fig. 8.3) ou com *swab* de algodão não absorvente ou de poliéster ou de Dacron[69]. O organismo é mais facilmente encontrado no sêmen do que na urina ou em esfregaços uretrais. Uma amostra fresca poderá ser obtida pela masturbação em um recipiente limpo e estéril. Também deve ser examinado o sedimento centrifugado (500 x *g*/5min) dos primeiros 20ml da urina matinal, colhida com ou sem massagem prostática. A secreção prostática (Fig. 8.4) e o material subprepucial são coletados com um *swab* molhado em solução salina isotônica (0,15M) tépida (ver p. 201).

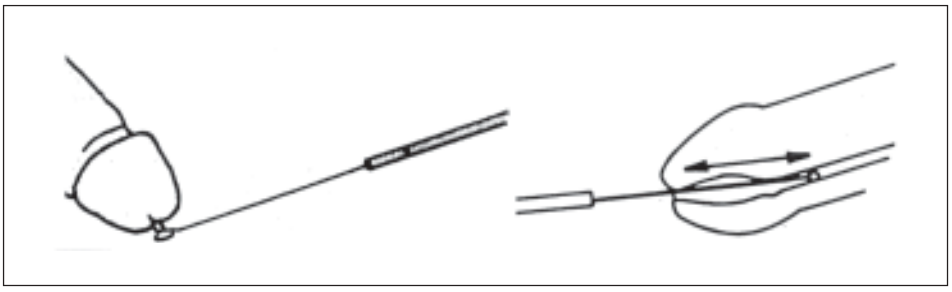


Fig. 8.3 — *Colheita de secreção uretral com uma alça de platina.*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

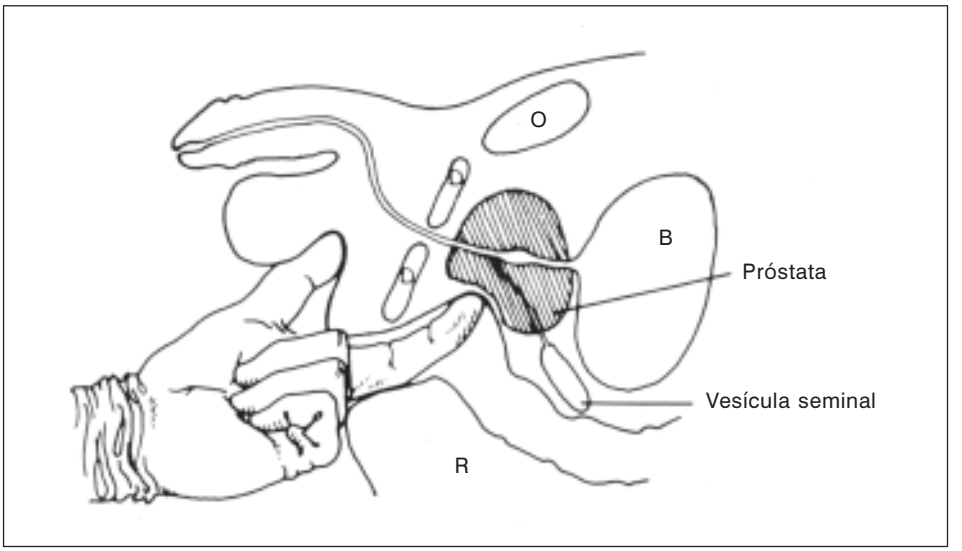


Fig. 8.4 — *Massagem prostática. D = diafragma prostático; O = osso púbico; B = bexiga; R = reto. (Segundo Moura RADA. Colheita de Material para Exame de Laboratório. Assegurando a qualidade dos serviços no laboratório clínico. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.)*

Mulher

As mulheres não deverão realizar a higiene vaginal, durante um período de 18 a 24 horas antes da colheita do material e não devem ter feito uso de medicamentos tricomonicidas, tanto vaginais (geléias e cremes) como orais, há mais de 15 dias. A vagina é o local mais facilmente infectado e os tricomonas são mais abundantes durante os primeiros dias após a menstruação. O material é usualmente colhido na vagina com *swab* de algodão não absorvente, com o auxílio de um espéculo não lubrificado. Embora a quantidade de exsudato absorvido possa ser pequena; os melhores resultados são obtidos com *swab* de algodão não absorvente ou de poliéster ou de Dacron[69]. Apesar de o trato urinário baixo poder ser, raramente, colonizado pelo *T. vaginalis*, o exame da urina ou de esfregaços uretrais não é indicado para a pesquisa do protozoário,

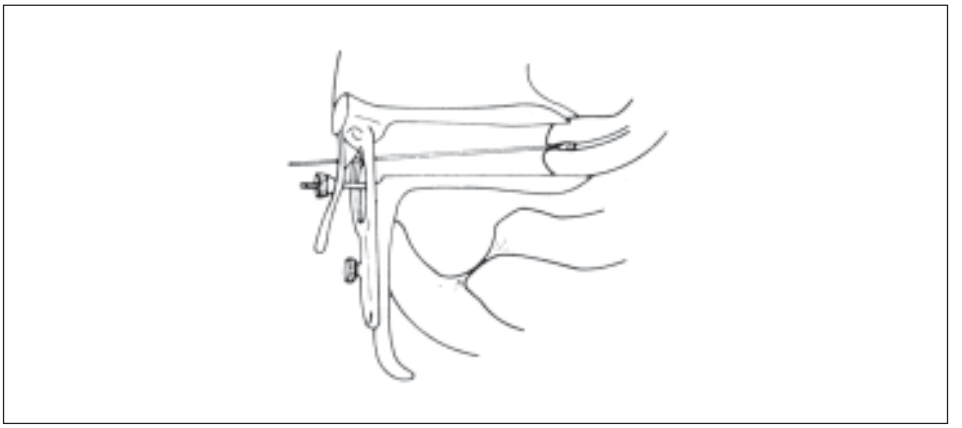


Fig. 8.5 — *Colheita de material na vagina com* swab *de algodão não absorvente com o auxílio de um espéculo não lubrificado.*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

exceto em mulheres com sintomas de infecção urinária. Quando houver sinais clínicos, deverão ser examinadas a uretra, as grandes glândulas vestibulares e as parauretrais. O período mais favorável para colher o fluido vaginal do saco posterior, quando o diagnóstico apresenta dificuldades, é entre o quarto e o quinto dia pós-menstrual. Deverão ser colhidos, sempre, dois *swabs* de cada paciente para facilitar os exames direto e cultural (Fig. 8.5).

Solução Salina Isotônica (0,15M)

Cloreto de sódio (NaCl)	8,767g
Água destilada-deionizada	1.000ml

• Dissolver o NaCl em uma pequena quantidade de água, completando após o volume. Armazenar à temperatura ambiente.

Preservação da Amostra

O *T. vaginalis* é suscetível à desidratação e às mudanças do potencial de oxidorredução. O material colhido de pacientes que não for examinado em preparações a fresco imediatamente após a colheita ou inoculado em meios de cultura, deverá ser preservado em líquidos ou em meios de transporte.

Reagentes

1. Glicose ($C_6H_{12}O_6$)
2. Cloreto de sódio (NaCl)
3. Cloreto de potássio (KCl)
4. Cloreto de cálcio ($CaCl_2.2H_2O$)
5. Cloreto de magnésio ($MgCl_2$)
6. Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)
7. Diidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4)
8. Hidrogenofosfato dissódico anidro (Na_2HPO_4)
9. Hidrogenocarbonato de sódio ($NaHCO_3$)
10. Tioglicolato de sódio
11. Glicerofosfato de sódio ($C_3H_7O_6PNa_2$)
12. Azul-de-metileno (CI 52015) ($C_{16}H_{18}ClN_3S.3H_2O$)
13. Carvão, pó
14. Ágar (Difco)

Preservação Temporária

Líquidos de Transporte: A solução salina isotônica (0,15M) glicosada a 0,2% mantém os tricomonas viáveis durante várias horas à temperatura

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

de 37°C, não havendo qualquer alteração na morfologia e na mobilidade. As soluções de Ringer e de Locke também podem ser usadas.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

1. Solução Salina Isotônica Glicosada a 0,2% (m/v)

Glicose	2g
Solução salina isotônica (0,15M)	1.000ml

• Dissolver a glicose na solução salina isotônica (ver p. 201).

2. Solução de Ringer

Cloreto de sódio	8g
Cloreto de potássio	0,2g
Cloreto de cálcio	0,2g
Cloreto de magnésio	0,1g
Diidrogenofosfato de sódio	0,1g
Hidrogenocarbonato de sódio	0,4g
Água destilada-deionizada	1.000ml

• Dissolver os quatro primeiros componentes em 900ml de água desmineralizada e autoclavar (121°C/15min). Dissolver o NaH_2PO_4 e o $NaHCO_3$ em 100ml de água destilada e filtrar em *Seitz* ou *Millipore*®. Misturar as duas soluções em condições de assepsia total.

3. Solução de Locke

Cloreto de sódio	9g
Hidrogenocarbonato de sódio	0,2g
Cloreto de potássio	0,42g
Cloreto de cálcio	0,25g
Glicose	2g
Água destilada-deionizada	1.000ml

• Dissolver o $CaCl_2$ em pequena quantidade e água e depois adicionar o sais remanescentes.

Meios de Transporte: Os meios de Stuart[75,82] e de Amies[1] modificados mantêm os organismos por um período de 24 horas. Após esse período há um significante declínio no número de parasitos. Nas primeiras 24 horas da preservação, a temperatura não tem influência nas culturas subseqüentes do protozoário, mas, após esse período, sobrevivem melhor quando

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

o meio é mantido a 4°C ou a 36°C. Os meios de transporte diluem o número de parasitos na amostra original, o que deve ser considerado quando os resultados forem negativos, através do exame de preparações a fresco e/ou pelo exame cultural.

1. Meio de Stuart[75,82]

Tioglicolato de sódio	1g
Glicerofosfato de sódio	10g
Cloreto de cálcio	0,1g
Azul-de-metileno	0,002g
Ágar	3g
Água destilada-deionizada	1.000ml

pH 7,5

Preparação e Colheita

1. Dissolver os ingredientes em 1.000ml de água e distribuir em tubos com rosca (*screw-capped*) 13 x 100mm, Pyrex n.º 9825, na razão de 7ml por tubo.

2. Autoclavar (121°C/15min). Deixar o tubos solidificarem na posição vertical. O meio solidificado mostra geralmente uma zona azul de aerobiose até a 1/3 da altura do meio. Quando essa zona ultrapassar mais da metade do meio, não deve ser utilizado para os fins previstos.

3. A incorporação do material a examinar ao substrato se realiza através de *swabs*, estéreis e secos, preparados com algodão não absorvente ou de poliéster, previamente mergulhados em solução tampão de fosfato de Sörensen 0,067M, pH 7,4 (ver p. 817).

4. Os *swabs* são introduzidos no meio de transporte, até a metade de seu tamanho. Os tubos são fechados hermeticamente e conservados sob refrigeração (4 a 5°C) até o momento do exame microscópico e da inoculação nos meios de cultura.

2. Meio de Amies

Cloreto de sódio	3g
Cloreto de potássio	0,20g
Cloreto de magnésio	0,10g
Diidrogenofosfato de potássio	0,20g
Hidrogenofosfato dissódico anidro	1,15g
Tioglicolato de sódio	1g
Carvão, pó	10g
Ágar (Difco)	4g
Água destilada-deionizada	1.000ml

pH 7,4

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Preparação e Colheita

1. Dissolver os componentes em 1.000ml de água tépida.

2. Distribuir o meio em tubos com tampa de rosca (*screw-capped*) 13 x 10mm, Pyrex n.º 9825, na razão de 7ml por tubo.

3. Fechar os tubos e autoclavar (121°C/15min).

4. Antes da solidificação do carvão, agitar e inverter os tubos a fim de obter uma perfeita homogeneização. Reapertar as tampas se necessário.

5. Usar *swabs* estéreis e secos, de algodão ou de poliéster, previamente mergulhados na solução tampão de fosfato de Sörensen pH 7,4 (ver p. 813).

6. Os *swabs* são introduzidos no meio de transporte, até a metade de seu tamanho. Os tubos são fechados hermeticamente e mantidos sob refrigeração (4-5°C) até o momento do exame microscópico e da inoculação nos meios de cultura.

Preservação Permanente

A solução do fixador álcool polivinílico (APV) preserva os microrganismos fixados sem que haja alterações na sua morfologia, estando assim esses organismos preparados para serem corados pelos métodos de Leishman, Giemsa, e pela hematoxilina férrica, segundo Heidenhain. Os protozoários e o sedimento de cultura fixados com o fixador APV podem ser armazenados por meses ou anos para serem usados como material de referência e/ou para o ensino. O fixador APV mantém-se em condições satisfatórias para o uso, por um período de seis meses a um ano, enquanto permanecer em recipiente de vidro ou de plástico opaco, hermeticamente fechados.

EXAME MICROSCÓPICO

O exame microscópico convencional de preparações a fresco e de esfregaços fixados e corados, junto com os métodos culturais, são os procedimentos laboratoriais mais comumente empregados no diagnóstico da tricomoníase urogenital[44,55,63]. Apesar de o exame microscópico direto do líquido prostático e do sedimento urinário não apresentar problemas na sua observação, a densidade dos leucócitos polimorfonucleares e as células epiteliais do exsudato vaginal tendem a dificultar e a obscurecer a pesquisa do protozoário, principalmente a visualização dos movimentos dos flagelos[71]. O diagnóstico da tricomoníase, tradicionalmente, depende da observação microscópica do protozoário móvel, através do exame direto de esfregaços a fresco com auxílio da microscopia de campo claro e/ou de campo escuro e/ou de contraste de fase, como, também, pela microscopia de esfregaços fixados e corados. Esses métodos requerem o mínimo de equipamento e são específicos para a pesquisa desse protozoário. Quando esse estudo apresentar resultados negativos, ele deve ser complementado pelo exame cultural.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Exame Direto a Fresco

Preparações Não-coradas: A microscopia da secreção vaginal ou cervical dos exsudatos uretrais e do líquido prostático diluídos em solução salina isotônica (0,15M) tépida (ver p. 201) é o exame de rotina usual para a identificação do flagelado. Esse método tem uma baixa sensibilidade quando comparado com os métodos culturais. O protozoário perde sua mobilidade característica quando as preparações permanecem em temperatura ambiente fria, tornando-se necessária uma observação microscópica rápida. O número de tricomonas por unidade de volume de exsudato vaginal varia de paciente para paciente, tornando-se necessária uma pesquisa cuidadosa e prolongada, quando poucos organismos estão presentes. As duchas vaginais baixam consideravelmente a sensibilidade dos esfregaços microscópicos a fresco, não ocorrendo o mesmo com os procedimentos culturais. Robertson e cols.[76] descreveram um método de concentração (sedimento concentrado) que aumentou a sensibilidade da pesquisa de *T. vaginalis* no exsudato vaginal. Inúmeros erros ocorrem no diagnóstico do flagelado em preparações a fresco. Nas infecções discretas, o número de protozoários é tão pequeno que o exame pode ser considerado negativo. Por outro lado, os leucócitos podem estar em movimento devido às espiroquetas, às bactérias flageladas, aos espermatozóides e/ou às células ciliadas aderidas a eles, simulando, assim, um tricomona. Coutts, Silva-Inzunza e Tallman[16] recomendam a observação de esfregaços a fresco pela microscopia de campo escuro. Entretanto, Roberston e cols.[76] concluíram que a microscopia de contraste de fase do sedimento centrifugado do exsudato vaginal é mais sensível e mais precisa do que a microscopia de campo claro no estudo das preparações frescas. Em montagens a fresco, o flagelado mantém sua mobilidade por várias horas, quando mantido à temperatura de 20°C entre lâmina e lamínula selada com parafina. Temperaturas que excedem a 44°C matam imediatamente o parasito; por esta razão, os esfregaços nunca deverão ser aquecidos na chama direta do bico de *Bunsen*. A pressão da lamínula inúmeras vezes causa mudanças na forma do organismo e, eventualmente, o protozoário flagelado desenvolve formações semelhantes a pseudópodes[7].

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Misturar em uma lâmina de microscopia ou em um tubo de hemólise, uma ou duas gotas (< 1,0ml) de solução salina isotônica (0,15M) tépida e uma pequena quantidade da amostra.

3. Quando o espécime não pode ser examinado imediatamente, colocar o *swab* nos meios de transporte de Stuart ou de Amies, que mantêm os organismos viáveis por aproximadamente 24 horas.

4. Coletar a urina em recipiente limpo e estéril. Centrifugar a urina (500 x *g*/5min) e examinar o sedimento para *T. vaginalis*. Não é necessário acrescentar solução salina ao sedimento urinário. Manter os espécimes à temperatura ambiente.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

5. A temperatura de refrigerador (4-5°C) inibe a motilidade, apresentando efeito deletério sobre os organismos. O retorno à temperatura ambiente não reverte esse efeito destruidor das características morfológicas.

6. Rejeitar qualquer amostra com mais de 24 horas.

7. Misturar a solução salina e a amostra com a ponta da pipeta ou com a ponta da lamínula. Cobrir a preparação com lamínula (18 x 18mm).

8. Examinar a preparação a fresco, para a pesquisa de organismos flagelados móveis, com objetiva de pequeno aumento (10X) e pouca iluminação. As estruturas suspeitas devem ser examinadas com objetiva de grande aumento (40X). Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

9. Os organismos são usualmente um pouco maiores do que os leucócitos polimorfonucleares[7].

Controle de Qualidade (CQ): Exame Direto a Fresco

1. Verificar diariamente os reagentes usados no exame direto a fresco.

2. A solução salina isotônica (0,15M) deve estar clara e sem contaminação visível.

3. A solução de iodo deve estar transparente e não contaminada por bactérias e fungos e deve conservar a cor marrom forte (chá da Índia ou "vinho do Porto") com cristais no fundo do frasco. Desprezar a solução que não apresentar essas características.

4. A solução *Vaginal Identification of Pathogens* (VIP) deve estar clara e sem contaminação visível.

5. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

6. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[7].

Observações

1. Não deixar os espécimes à temperatura ambiente por um longo período (usualmente > 1 hora). Os organismos tornam-se redondos, perdem a motilidade e eventualmente morrem. A motilidade pode ser ocasionalmente intensificada a 37°C, mas esta temperatura não revive os organismos mortos.

2. Quando um esfregaço seco é enviado ao laboratório, o mesmo pode ser salvo pela fixação (álcool metílico) e subseqüente coloração (corante de Giemsa diluído a 1:20 e durante 20 minutos).

3. O organismo corado pode apresentar dificuldades de observação, entretanto se o protozoário for identificado como *T. vaginalis*, essa informação apresenta relevância clínica.

4. O exame direto a fresco revela os organismos em 75% a 85%[28,30] dos pacientes infectados. Amostras urogenitais podem ser contaminadas por material fecal de pacientes infectados com *T. hominis*, conseqüentemente, um resultado falso-positivo pode ser reportado.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

5. O *T. hominis* e o *T. vaginalis* são semelhantes na forma. Entretanto, a posição da membrana ondulante permite uma diferenciação morfológica entre esses dois protozoários flagelados (Tabela 6.1).

6. Métodos alternativos de diagnóstico, como a cultura, detecção de antígenos monoclonais[66], esfregaços permanentes corados e colheita de uma segunda amostra para exame, deverão ser usados.

Preparações Coradas

Com o objetivo de aumentar a sensibilidade do exame microscópico direto, vários corantes são adicionados às montagens salinas. Apesar dos tricomonas não se corarem com a safranina, o verde de malaquita, o azul-de-metileno e com o azul cresil brilhante, os elementos celulares tomam os corantes e contrastam com os organismos vivos não corados; somente os flagelados mortos são corados intensamente. Esses corantes, entretanto, não têm se mostrado convincentes na melhoria do grau de identificação dos tricomonas nas secreções e não devem ser recomendados para a rotina laboratorial. Coutts e Silva-Inzunza[15] sugeriram a coloração vital com solução aquosa de fluoresceína adicionada às preparações salinas para melhorar a pesquisa do parasito no material fresco. Barchet[3] desenvolveu o método *Vaginal Indentification of Pathogens* (VIP), para corar os tricomonas no material obtido de pacientes. Este procedimento de coloração com o cristal violeta diluído no tampão de fosfato de Sörenson (pH 6,0) é especialmente útil quando os organismos estão em pequeno número e são freqüentemente atípicos. A sensibilidade dos esfregaços microscópicos a fresco é geralmente baixa, mas a especificidade é alta.

Corante — *Vaginal Identification of Pathogens* (VIP)

Em 1972, Barchet[3] desenvolveu o método *Vaginal Identification of Pathogens* (VIP) para corar tricomonas no material obtido de pacientes. Este procedimento de coloração com cristal violeta diluído no tampão de fosfato de Sörenson (pH 6,0) é especialmente útil quando os organismos estão em pequeno número e são freqüentemente atípicos.

Amostra

Homem

Secreção uretral, primeira urina matinal (sedimento centrifugado da urina matinal), secreção prostática, sêmen, raspado da mucosa uretral e lavado prepucial (material subprepucial).

Mulher

Secreção vaginal e primeira urina matinal. Quando houver sinais clínicos deverão ser examinadas a uretra, as grandes glândulas vestibulares e as parauretrais.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Reagentes

1. Cristal violeta, cristais (CI 42555) ($C_{25}H_{30}ClN_3$)
2. Solução tampão de Sörensen (ver p. 816)

Preparação das Soluções

Solução Estoque

Cristal violeta, cristais	200mg
Solução tampão de Sörensen, pH 6,0	100ml

• Dissolver o cristal violeta em 100ml de solução tampão. Aquecer em banho de água a 60°C durante duas horas. Filtrar em filtro bacteriológico *Millipore*®. Armazenar sob refrigeração (4 a 5°C), em frasco opaco hermeticamente fechado. Validade: um ano.

Corante

Solução estoque	10ml
Solução tampão de Sörensen, pH 6,0	40ml

• Misturar as soluções. Aquecer em banho de água a 60°C durante uma hora. Preparar o corante mensalmente.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.
2. Colocar em uma lâmina de microscopia duas gotas do corante VIP e igual volume de exsudato. Cobrir com lamínula e examinar com objetiva de pequeno aumento (10X).

Características da Coloração

A coloração a fresco VIP é um acurado e eficiente método para o diagnóstico das vaginites. Os tricomonas móveis com atividade intensa são facilmente diagnosticados; neste caso, a coloração não favorece o reconhecimento dos flagelados. A identificação é dificultada diante de organismos imóveis; pacientes submetidos a uma ducha recente e terapêutica ineficiente. O efeito do corante entre os tricomonas móveis é variável. No entanto, nos menos ativos ou presumivelmente mortos, o núcleo apresenta-se corado em azul intenso[3].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Coloração pela Solução de Iodo de D'Antoni

Reagente

1. Solução de Iodo de D'Antoni (ver p. 39)

Dissolver 1g de iodeto de potássio em 100ml de água. Adicionar lentamente 1,5g de cristais de iodo e agitar a mistura até a completa dissolução. Filtrar e estocar em frasco de cor âmbar com tampa esmerilhada, ao abrigo da luz. Preparar novas soluções depois de 10 a 14 dias. Indicar a data de validade no rótulo do frasco.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.
2. Colocar uma ou duas gotas de solução de iodo de D'Antoni e igual volume de exsudato ou de sedimento urinário, cobrindo a preparação com uma lamínula.
3. Examinar o esfregaço a fresco com objetiva de pequeno aumento (10X) e pouca iluminação.
4. As estruturas suspeitas devem ser examinadas com objetiva de grande aumento (40X). O axóstilo dos organismos imóveis são corados pela solução de iodo, evidenciando a presença do trofozoíto de *T. vaginalis.*

Preparações Fixadas e Coradas

Devido às limitações do exame microscópico direto, uma variedade de métodos de coloração tem sido indicada para o diagnóstico do *T. vaginalis* no homem e na mulher. Os principais são: alaranjado de acridina[11,25,49,70,78,87], Giemsa[8,49,62,79], Leishman[38,48], Diff-Quik[49,59], Fontana[67], Gram[18,81], ácido periódico de Schiff[77], imunoperoxidase[35], hematoxilina férrica[42] e Papanicolaou[45]. No entanto, poucos estudos foram realizados com o objetivo de comparar a cultura com as preparações fixadas e coradas[84]. Recomenda-se simultaneamente o emprego de vários exames microscópicos de preparações fixadas e coradas para a obtenção de melhores resultados. Em contraste com os outros procedimentos de coloração, a identificação de tricomonas pela técnica de Papanicolaou para esfregaços de secreções cervicais e vaginais tem sido usada com muita freqüência, embora uma série de óbices e erros sejam atribuídos ao diagnóstico dos esfregaços citológicos corados por esta técnica[45,73,74]. O alaranjado de acridina[33] é um corante fluorescente dos ácidos nucléicos, sendo usado para diferenciar nas células o DNA do RNA[66]. A coloração pelo alaranjado de acridina de esfregaços vaginais para a pesquisa de tricomonas apresenta resultados favoráveis quando comparado com o exame direto a fresco. Entretanto, não existe consenso entre os diferentes autores no uso desse procedimento na rotina laboratorial para o diagnóstico do *T. vaginalis*[53]. Nos esfregaços

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

vaginais corados os organismos apresentam freqüentemente dificuldades na diferenciação do organismo de outras células do trato geniturinário. A especificidade do método é um problema que ainda suscita sérias dúvidas.

Coloração de Giemsa

Esfregaços fixados do exsudato vaginal corados pelo método de Giemsa têm sido usados, exaustivamente, nos últimos 50 anos para o diagnóstico do *T. vaginalis*. Alguns autores[8,49,62] afirmam que maior número de infecções são identificadas pelo exame microscópico de esfregaços corados pelos derivados de Romanowsky do que pela microscopia do exame direto a fresco e que em alguns grupos a sensibilidade desse método de diagnóstico se aproxima à do exame cultural[35].

Reagentes e Preparação (ver p.296)

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.

2. Em uma lâmina de microscopia, misturar uma ou duas gotas de solução salina isotônica (0,15M) e uma pequena quantidade da amostra. Não é necessário acrescentar solução salina ao sedimento de urina.

3. Preparar o esfregaço. Deixar secar à temperatura ambiente.

4. Fixar o esfregaço com álcool metílico durante cinco minutos (usar cuba de *Coplin* nesta fase da coloração).

5. Corar o esfregaço durante 45 minutos com a solução de Giemsa diluída a 5% em tampão de fosfato pH 7,2 (usar cuba de *Coplin* nesta fase da coloração).

6. Lavar o esfregaço com água corrente (para remover o excesso da solução corante). Deixar secar à temperatura ambiente na posição vertical.

7. Examinar o esfregaço com objetiva de imersão (100X).

8. Os organismos são usualmente um pouco maiores do que leucócitos polimorfonucleares.

Observações

1. A fixação e a coloração são usualmente realizadas na cuba de *Coplin*.

2. A solução corante de Giemsa deve ser preparada fresca diariamente.

3. Em nosso laboratório é usado com grande sucesso para a coloração dos tricomonas em exsudatos e em culturas o método de Giemsa, no qual a solução corante é diluída a 5% em tampão de fosfatos pH 7,2. Jirovec e Petrú[42] coraram o esfregaço durante 60 minutos com a solução de Giemsa diluída (1:10) em tampão de fosfato pH 7,2.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

4. Os espécimes devem ser examinados dentro de uma hora após a colheita. Depois de uma hora os organismos perdem a mobilidade, principalmente quando começam secar e a morfologia dos esfregaços permanentes corados apresenta dificuldades na sua observação.

5. Quando um esfregaço seco é enviado ao laboratório, o mesmo pode ser salvo pela fixação (álcool metílico) e subseqüente coloração pelo corante de Giemsa (ver método anteriormente descrito).

6. O organismo corado pode apresentar dificuldades de observação; entretanto, se o protozoário for identificado como *T. vaginalis*, essa informação apresenta relevância clínica.

7. As amostras urogenitais podem ser contaminadas por material fecal de pacientes infectados com *T. hominis*; conseqüentemente, um resultado falso-positivo pode ser reportado.

8. O *T. hominis* e o *T. vaginalis* são semelhantes na forma. Entretanto, a posição da membrana ondulante permite uma diferenciação morfológica entre esses dois protozoários flagelados[38].

Características da Coloração

O protozoário pode apresentar forma alongada, fusiforme ou oval, corando-se em azul brilhante, com pequeno e excêntrico núcleo escuro (violeta-avermelhado). O axóstilo e os flagelos são perfeitamente observados. A membrana ondulante e os flagelos coram-se de violeta-escuro (Fig. 8.6).

Controle de Qualidade (CQ): Coloração de Giemsa

1. Verificar diariamente os reagentes usados no exame direto a fresco.

2. A solução salina isotônica (0,15M) deve estar clara e sem contaminação visível.

3. Corante de Giemsa: preparar esfregaço estirado sangüíneo para controle de qualidade do corante de Giemsa. Avaliar microscopicamente as reações de coloração das plaquetas, eritrócitos e leucócitos.

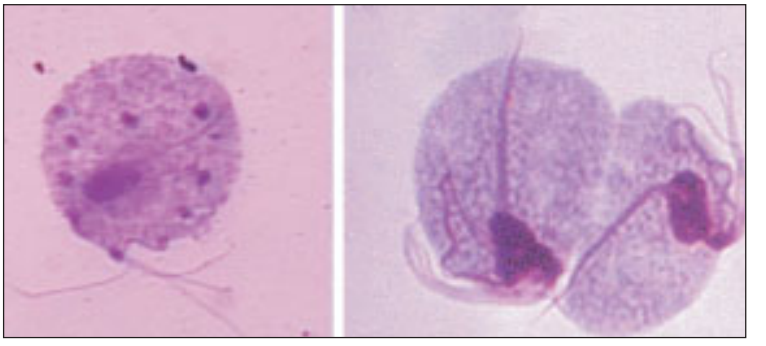


Fig. 8.6 — *Trofozoítos de* Trichomonas vaginalis *corados pelo método de Giemsa. (Adaptada de Pappas PW, Wardrop SM e Oklahoma State University, College of Veterinary Medicine; 1999. Disponível em <URL: http://calvin.biosci.ohio-state-edu/~zoology> [1997 Jan 24].)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

4. Solução tampão de fosfato: verificar diariamente se as soluções tampão de fosfato pH 6,6-7,2 e a água tamponada estão claras, sem vestígios de contaminação e de precipitação. O pH deve ser testado antes da preparação do corante.

5. Antes do uso, controlar a solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato, pH 7,2.

6. Rever o controle de qualidade do corante de Giemsa, antes da pesquisa dos organismos.

7. Manter criopreservada uma cultura padrão de *T. vaginalis* (ATCC 30.001). Cultivar semanalmente essa amostra. Corar uma lâmina preparada com a cultura-padrão em paralelo com a lâmina do material colhido do paciente. Os resultados somente serão aceitos quando o controle de qualidade dos organismos da cultura padrão estão bem corados.

8. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

9. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[8].

EXAME DAS CULTURAS

Muitos meios de cultura líquidos ou semi-sólidos têm sido descritos para o isolamento e manutenção axênica do *T. vaginalis*[17,42,56]. Depois que foi possível cultivar amostras de tricomonas pela adição de penicilina e estreptomicina aos meios, o diagnóstico, o isolamento e a manutenção de tricomonas tornou-se fácil e as culturas puderam ser padronizadas, facilitando o diagnóstico laboratorial da tricomoníase e o controle dos resultados da terapêutica. A cultura é o método mais sensível para o diagnóstico da tricomoníase; entretanto, são necessários três a quatro dias para determinar a existência de crescimento. A cultura axênica do organismo é imprescindível para o diagnóstico e para estudos bioquímicos, fisiológicos, metabólicos, imunológicos e da ultra-estrutura do parasito, como também para a triagem de medicamentos *in vitro*. A cultura axênica de tricomonas permite o estudo e o entendimento do processo patológico pela inoculação em animais de experimentação com organismos que cresceram em culturas e, desse modo, simular a ocorrência do processo natural da doença em laboratório. Para o diagnóstico de laboratório é indispensável o estudo simultâneo da cultura, do exame direto a fresco e de esfregaços permanentes corados. Quando o exame microscópico é positivo, a terapêutica apropriada poderá ser administrada ao paciente antes mesmo do resultado da cultura. Os principais meios de cultura usados são: o de Johnson e Trussell[43] e Trussell e Johnson[85] (CPLM), o de Kupferberg, Johnson e Sprince[48] (STS), o de Diamond[19] (TYM), o de Feinberg-Whittington[23] o TYM modificado por Hollander[36,53] e Kulda e cols.[47,53], e o meio CMRL 1055 modificado[51,52,53]. Ver, no Capítulo 25, Cultivo de Protozoários: *Trichomonas vaginalis*.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

IMUNODIAGNÓSTICO

O diagnóstico imunológico da tricomoníase urogenital tornou-se possível quando o parasito pôde ser cultivado *in vitro*. O imunodiagnóstico através de reações de aglutinação direta (AD), hemaglutinação indireta (HA), fixação do complemento (RFC), imunofluorescência indireta (RIFI), imunofluorescência direta (IFD), usando anticorpos monoclonais e técnicas imunoenzimáticas (EIE), tem contribuído para aumentar o índice de certeza dos resultados[37,39].

Esses procedimentos não substituem os exames parasitológico e cultural, mas podem completá-los, quando negativos. O imunodiagnóstico tem significado maior nos casos de pacientes assintomáticos, permitindo uma triagem adequada com a possibilidade de um tratamento precoce e uma diminuição do risco de transmissão. Estudos comparativos mostraram haver uma expressiva relação entre os resultados obtidos na detecção direta de *T. vaginalis* pelos anticorpos monoclonais fluorescentes e o exame direto a fresco, como também na pesquisa do organismo através de esfregaços corados permanentes e pelo exame cultural[45]. A especificidade dos testes imunológicos é variável, por essa razão cuidados deverão ser observados contra o termo "falso-positivo" para descrever uma reação positiva em paciente aparentemente não-infectado, visto que os anticorpos dos tricomonas podem persistir por um longo período após o tratamento ou após uma cura espontânea. Estudos adicionais deverão ser realizados com novos antígenos para investigar as diferenças existentes entre as cepas do parasito. Os testes imunológicos não são rotineiramente usados no diagnóstico dessa protozoose, apesar da relativa especificidade e sensibilidade dos diferentes procedimentos[30,74].

Observações

1. A diferenciação clínica das diferentes formas das infecções vaginais é irrealizável e o diagnóstico acurado da tricomoníase em pacientes de ambos os sexos depende da demonstração do organismo nos espécimes genitais.

2. Isoladamente, a sintomatologia é insuficiente para se fazer o diagnóstico do tipo de infecção.

3. A sensibilidade dos vários métodos e técnicas está sumarizada na Tabela 8.1[73,74]. Os tricomonas são identificados na secreção vaginal através do exame direto a fresco, que detecta os flagelados em mais de 60% das mulheres infectadas. O *T. vaginalis* é mais facilmente reconhecido pelas suas características de movimento. O exame direto a fresco também revela grande número de leucócitos, apesar das mulheres assintomáticas apresentarem pequeno número de células brancas sangüíneas.

4. Na infecção pelos tricomonas as células epiteliais aparecem normais no exame direto a fresco e a flora bacteriana consiste em bacilos ou em coco-bacilos. A cultura do endocérvix é usualmente positiva, os espécimes da região endocervical não devem ser usados para o diagnóstico microscópico

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Tabela 8.1
Sensibilidade dos Métodos e Técnicas Usados para a Identificação de *Trichomonas vaginalis* nos Espécimes Vaginais[73,74]

Procedimentos	*Sensibilidade*
Exame direto a fresco	49-80%
Imunofluorescência	64-90%
Coloração de Gram	< 1%
Coloração pelo alaranjado de acridina	~66%
Coloração de Giemsa	35-60%
Fixação do Látex	56-90%
ELISA	77-93%
Citologia Cervical	60-70%
Cultura	85-90%

da tricomoníase, porque somente pequeno número de organismos estão presentes naquele lugar.

5. O exame direto a fresco do material obtido com alça de platina da uretra anterior de homens revela o organismo em 50% a 90% das infecções. Enquanto a cultura do material de raspado da uretra apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 80%, o exame das culturas do sedimento da primeira urina mostra o organismo em 70% dos casos. A massagem prostática antes da coleta da urina possivelmente aumenta a sensibilidade para 95%. A cultura continua sendo a mais sensível técnica (> 95%) para o diagnóstico da tricomoníase[74].

6. As colorações de Gram, Giemsa, Pappenhein e o alaranjado de acridina apresentam resultados inferiores ao exame direto a fresco no diagnóstico da tricomoníase em pacientes de ambos os sexos. O método de Papanicolaou apresenta uma sensibilidade de 56% a 78%; entretanto, considera-se a possibilidade de resultados falso-positivos com o método de Papanicolaou. Quando a citologia vaginal pelo método de Papanicolaou for sugestiva de tricomoníase, deve-se sempre recorrer ao exame direto ou a outro método para confirmar o diagnóstico. Nos casos de vaginite inflamatória com exame direto negativo para *T. vaginalis*, faz-se necessário o emprego do exame cultural[74].

7. As técnicas da imunofluorescência indireta, aglutinação do látex e ELISA são mais sensíveis do que o exame direto a fresco (80-90%); entretanto, menos sensíveis do que o exame cultural. O imunodiagnóstico apresenta problemas relacionados com a falta de especificidade, principalmente nas populações de alto risco, nas quais os anticorpos podem existir antes da infecção. A sensibilidade também é baixa[74]. Lossick[54] e Lossick e Went[55] relatam que 69% a 70% das infecções pelo tricomonas podem ser diagnosticadas pelo exame direto a fresco. A sensibilidade desse exame varia de 40% a 60%, quando realizado por microscopista com razoável experiência e atinge os índices de 60% a 90% quando executado por microscopista altamente treinado.

8. O exame direto a fresco é um exame rápido, com especificidade virtual de 100%. Os autores concordam que a cultura (85% a 90%) das secreções é um excelente procedimento para o diagnóstico do *T. vaginalis*.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

9. O uso de anticorpos monoclonais e sondas de DNA para a detecção de *T. vaginalis* tem sido relatado como eficiente para o diagnóstico desse protozoário[13]. Os testes imunoenzimáticos estão sendo desenvolvidos para a detecção de anticorpos de *T. vaginalis* em *swabs* vaginais. O valor preditivo desses testes positivos foi de 82% e dos testes negativos, 99,3%[74].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amies CR. A modified formula for the preparation of Stuart's transport medium. Can J Public Health, 58:296-300, 1967.
2. Ash LR, Oriehl TC. Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. Chicago (Ill): ASCP Press, 1991.
3. Barchet S. A new look at vaginal discharges. Obstet Gynecol, 40:615-617, 1972.
4. Beal CB, Viens P, Grant RGL et al. A new technique for sampling duodenal contents. J Trop Med Hyg, 19:349-352, 1970.
5. Beaver PC. Methods of pinworm diagnosis. Am J Trop Med, 29:577, 1949.
6. Brooke MM, Donaldson AW, Mitchell RB. A method of supplying cellulose tape to physicians for diagnosis of enterobiasis. Pub Health Rep, 64:897-901, 1949.
7. Bruckner DA. Urogenital specimens: direct saline mount. In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press,.p.7.6.6.1-7.6.6.4. v.2, 1992.
8. Bruckner DA. Urogenital specimens: permanent stained smear (Giemsa). In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.6.7.1-7.6.7.4, v.2, 1992.
9. Bruckner DA. Urine concentration: Centrifugation. In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.6.8.1-7.6.8.4. v.2, 1992.
10. Bruckner DA. Urine concentration: Membrane filter (Nucleopore). In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.6.9.1-7.6.0.4, v.2, 1992.
11. Buharowski K, Wolanska M. Usefulness of samples stained with acridine orange for diagnosis of women's trichomonadosis. Wiad Parazytol, 30:499-501, 1984.
12. Carroll MJ. Examination for pinworm: Cellulose tape preparation. In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.6.1.1-7.6.4.3, v.2, 1992.
13. Chang TH, Tsing SY, Tzeng S. Monoclonal antibodies against *Trichomonas vaginalis*. Hybridoma, 5:43-51, 1986.
14. Cook J. Duodenal contents: string test (Entero-Teste Capsule). In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.6.4.1-7.6.4.5, v.2, 1992.
15. Coutts WE, Silva-Inzunza. Vital staining of *Trichomonas vaginalis* with fluorescein. Br J Vener Dis, 44:43-44, 1954.
16. Coutts WE, Silva-Inzunza E, Tallman B. Infestations à *Trichomonas*. Uro int, 9:189-208, 1959.
17. Cox PJ, Nicol CS. Growth studies of various strains of *Trichomonas vaginalis* and possible improvement in the laboratory diagnosis of trichomoniasis. Br J Vener Dis, 49:536-539, 1973.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

18. Cree LZ. *Trichomonas vaginalis* in Gram-stained smears. Br J Vener Dis, 44:226-227, 1968.

19. Diamond LJ. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. J Parasitol, 43:488-490, 1957.

20. Dock, G. *Trichomonas* as a parasite of man. Am J M Sci, 3:1-22, 1896.

21. Donné MA. Animalcules observes dans les matieres purulentes et le produit des secretions des organes genitaux de l'homme et de la femme. C R Acad Sci Paris, 3:385-386, 1836.

22. Faust EC, Russell PF. Craig and Faust's Clinical Parasitology. 7th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1964.

23. Feinberg JG, Whittington MJ. A culture for *Trichomonas vaginalis* Donné and species of Candida J Clin Path, 10:327-329, 1957.

24. Foust AC, Kraus SJ. *Trichomonas vaginalis*. Revaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. J Infect Dis, 141:133-143, 1980.

25. Fripp PJ, Masson PR, Super H. A method for diagnosis of *Trichomonas vaginalis* in clinical specimens. Med Lab Sci, 37:85-88, 1975.

26. Garcia LS. Sigmoidoscopy specimen: Direct wet smear. In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.6.2.1-7.6.2.5, v.2, 1992.

27. Garcia LS. Sigmoidoscopy specimen: Permanent stained smear. In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.6.3.1-7.6.3.3, v.2, 1992.

28. Garcia LS. Laboratory methods for diagnosis of parasitic infections. In: Baron EJ, Peterson L, Finegold SM ed. Diagnostic Microbiology. 9th ed. Philadelphia: CV Mosby Co., 776-861, 1994.

29. Garcia LS, Bullock-Iacullo S, Palmer J et al. Diagnosis of parasitic infections: collections, processing and examination of specimens. In: Murray PR ed. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed, Washington (DC): ASM Press, 1145-1158, 1995.

30. Garcia L S, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3nd ed. Washington (DC): ASM Press, 1997.

31. Gardner WA, Culberson DE. Pathology of urogenital trichomoniasis in men. In: Honigberg BH ed. Trichomonads Parasitic in Humans. New York: Springer-Verlang, 291-296, 1989.

32. Graham CF. A device for the diagnosis of *Enterobius vermicularis*. Am J Trop Med, 21:159-161, 1941.

33. Greenwood JR, Kirk-Hillaire. Evaluation of acridine orange stain for detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal specimes. J Clin Microbiol, 14:699, 1981.

34. Hall MC. Studies on oxyuriasis. I. Types of anal swabs and scrapers, with a description of an improved type of swabs. Am J Trop Med, 17:445-453, 1937.

35. Hayes BS, Kotcher E. Evaluation of techniques for the demonstration of *Trichomonas vaginalis*. J Parasitol 46(Suppl):45, 1960.

36. Hollander DH. Colonial morphology of *Trichomonas vaginalis* in agar. J Parasitol, 62:826-828, 1976.

37. Honigberg BH. Trichomonads of importance in human medicine In: Kreier JP, editor. Parasitic Protozoa. New York: Academic Press, 276-454, v.2, 1978.

38. Honigberg BM. Taxonomy and nomenclature. In: Honigberg BM ed. Trichomonads Parasitic in Humans. New York: Springer-Verlang, 3-4, 1989.

39. Honigberg BM, Burgess DE. Trichomonads of importance in human medicine including *Dientamoeba fragilis*. In: Kreier JP ed. Parasitc Protozoa. 2nd ed. New York: Academic Press, 1-109, v.9, 1994.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

40. Ishikura H, Kikichi K. Intestinal. Anisakiasis in Japan. Infected fish, sero-immunological diagnosis, and prevention. Tokyo: Springer-Verlang, 1990.

41. Jacobs AH. Enterobiosis in children; incidence, symptomatology and diagnosis, with a simplified scotch cellulose tape technique. J Pediatrics, 21:497-503, 1942.

42. Jirovec O, Petrú M. *Trichomonas vaginalis* and trichomoniasis. Ad Parasitol, 6:117-188, 1968.

43. Johnson G, Trussell RE. Experimental basis for the chemotherapy of *Trichomonas vaginalis* infections. I. Proc Soc Exp Biol Med, 54:245-249, 1943.

44. Kean BH, Day E. *Trichomonas vaginalis* infection: An evaluation of three diagnostic techniques with data on incidence. Am J Obstet Gynecol, 68:1510-1518, 1954.

45. Krieger JN, Tan MR, Stevens CE et al. Diagnosis of trichomoniasis. Comparison of conventional wet-mount examination with cytologic studies, cultures and monoclonal antibody staining of direct specimens. JAMA, 259:1223-1227, 1988.

46. Krieger JN. Epidemiology and clinical manifestations of urogenital trichomoniasis in men. In: Honigberg BH ed. Trichomonads Parasitic in Humans. New York: Springer-Verlang, 235-245, 1989.

47. Kulda J, Honigberg BM, Frost JK et al. Pathogenicity of *Trichomonas vaginalis*. Am J Obstet Gynecol 1970;108:908-919.

48. Kupferberg AB, Johnson G, Sprince H. Nutrional requirements of *Trichomonas vaginalis*. Proc Soc Exp Biol Med, 67:304-308, 1948.

49. Levett PN. A comparison of five methods for the detection of *Trichomonas vaginalis* in clinical specimes. Med Lab Sci, 37:85-88, 1980.

50. Liebman WM, Rosenthal P. Comparative study of stool examination, duodenal aspirate, and pediatric Entero-Test for giadiasis in children. J Pediatr, 96:278, 1980.

51. Linstead D. Further studies on the cultivation of *Trichomonas vaginalis* in a defined medium. Parasitology, 81:18-19, 1980.

52. Linstead D. New defined and semi-defined media for cultivation of the flagellate *Trichomonas vaginalis*. Parasitology, 83:125-137, 1981.

53. Linstead D. Cultivation. In: Honigberg BM ed. Trichomonads Parasitic in Humans. New York: Springer-Verlag, 91-111, 1989.

54. Lossick JG. Treatment of sexually transmitted vaginosis/vaginitis. Rev Inf Dis, 125:665-681, 1990.

55. Lossick JG, Went HL. Trichomoniasis: Trends in diagnosis and man agement and management. Am J Obstet Gynecol, 165:1217-1222, 1991.

56. Lowe GH. A comparison of current laboratory methods with a new semisolid culture medium for the detection of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Pathol, 18:432-434, 1965.

57. Mallory FB. Pathological Technique. Philadelphia: WB Saunders Co., 1944.

58. Marchand F. Ueber das Vorkommen von *Trichomonas* im Harne eines Mannes, nesbt Bemerkungen über *Trichomonas vaginalis*. Centrabl f Bakt, 15:709-721, 1894.

59. MacMillan A. Laboratory diagnostic methods and cryopreservation of trichomonads. In: Honigberg BH ed. Trichmonads Parasitic in Humans. New York: Springer- Verlang, 297-310, 1989.

60. Markell EK, John DT, Krotoski WA. Markell and Voges. Medical Parasitology. 8th ed. Philadelphia: WB Saunders Co., 1999.

61. Markey RL. A vaseline swab for the diagnosis of *Enterobius* eggs. Am J Clin Pathol, 20:493, 1950.

62. Mason PR, Super H, Fripp PJ. Comparison of four techniques for the routine diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infections. J Clin Pathol, 29:154-157, 1976.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

63. McCann JS. Comparison of direct microscopy and culture in the diagnosis of trichomoniasis. Br J vener Dis, 50:450-452, 1974.

64. Melvin DM, Brooke MM. Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites. 3rd ed. HHS publication No (CDC)82-8282. Atlanta: Laboratory Training and Consultation Division, Centers for Disease Control, 1982.

65. Miura K. *Trichomonas vaginalis* im frischgelassen Urine eines Mammes. Centrabl f Bakt, 16:67-74, 1894.

66. Muresu R, Robino S, Rizzu P et al. A new method for identification of *Trichomonas vaginalis* by fluorescent DNA in situ hybridization. J Clin Microbiol, 32:1018-1022, 1994.

67. Nagesha CN, Anathakrishana NC, Solochama P. Clinical and laboratory studies on vaginal trichomoniasis. Am J Obstet Gynecol, 106:933-935, 1970.

68. Nathan MB, Lambourne A, Monteil S. Evaluation of a membrane (Nucleopore) filtration method using capillary blood for the detection of microfilariae. Am Trop Med Parasitol, 76:339-345, 1982.

69. Oates JK, Selwin S, Breach MR. Polyester sponge swab to facilitate examination for genital infection in women. Br J Vener Dis, 47:289-292, 1971.

70. Ortoloni G, Campanile E. Metodi diagnostici per la trichomoniasi vaginale Esame microscopico a fresco, esame microscopico dopo colorazione, esame culturale, esame mediante ante la microscopi a fluorescenza. Nuovi Annali Ig Microb, 17:539-549, 1966.

71. Perl G. Errors in the diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. As observed among 1199 patients. Obstet Gynecol, 39:7-9, 1972.

72. Pugh RNH. Periodicity of output of *Schistosoma haematobius* eggs in the urine. Ann Trop Med Parasitol, 73:89-90, 1979.

73. Rein MF. Clinical manifestation of urogenital trichomoniais in women. In: Honigberg BM ed. Trichomonads Parasitic in Humans. New York: Springer- Verlang, 225-234, 1989.

74. Rein MF. *Trichomonas vaginalis*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 2493-2497, 1995.

75. Ringartz O. A modified Stuart medium for the transport of gonococcal specimens. Acta Pat Microbiol, 48:105-112, 1960.

76. Robertson DHH, Lumsden WHR, Fraser KF et al. Simultaneous isolation of *Trichomonas vaginalis* and collection of vaginal exudate. Br J vener Dis, 45:42-43, 1969.

77. Rodriguez-Martinez HA, Rosales de la Luz M, de Bello LG et al. Adequate staining of *Trichomonas vaginalis* by Mac. Mannus'periodic acid-Schiff stain. Am J Clin Pathol, 59:741-746, 1973.

78. Rogers S, Goldsmid JM. A study of the possible value of acridine orange-O stain in the diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. Cent Afr J Med, 23:56-58, 1977.

79. Rothenbacher HJ, Hitchcock DJ. Heat fixation and Giemsa staining for flagella and other cellular structure of trichomonads. Stain Technol, 37:111-113, 1962.

80. Smith JW, Barlett MS. Diagnostic parasitology: introduction and methods. In: Balows A, Shadomy WJ, editores. Manual of Clinical Microbiology. 5th ed. Washington (DC): ASM Press, 701-716, 1991.

81. Sobrepen RL. Identification of *Trichomonas vaginalis* in Gram-stained smears. Lab Med, 11:558-560, 1980.

82. Stuart RD. Transport problems in public health bacteriology. Can J Public Health, 47:114-122, 1956.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

83. Thomas GE, Goldsmid JM, Wicks ACB. Use of the Enterotest duodenal capsule in the diagnosis of giardiasis. S Afr Med J, 48:2219-2220, 1974.

84. Thomason JL, Gelbart SM, Sobun JF et al. Comparison of four methods to detect *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol, 26:1869-1970, 1988.

85. Trussell RE, Johnson G. *Trichomonas vaginalis* Donné. Recent experimental advances. Puerto Rico J Pub Hlth Trop Med, 20:289, 1945.

86. Tsuji M. Immunodiagnosis for intestinal anisakiasis. In: Ishikura H, K. Kikichi K, editores. Intestinal Anisakiasis in Japan. Infected fish, sero-immunological diagnosis, and prevention. Tokyo: Springer-Verlang, 155-157, 1990.

87. Van Nieker WA. Acridine-orange fluorescence microscopy in the detection of pathogenic vaginal flora. Obstet Gynecol, 20:96-601, 1962.

88. Whiteside ME, Barkin JS, May RG et al. Enteric coccidiosis among patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Am J Trop Med Hyg, 33:1065-1072, 1984.

© *Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.*

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Capítulo 9



Escarro, Aspirados, Material de Biópsia e Exame dos Tecidos

Geraldo Attilio De Carli

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O exame do escarro, de aspirado e de material de biópsia para o diagnóstico das infecções parasitárias é de extrema importância, particularmente quando os métodos e as técnicas de rotina não foram eficientes para a demonstração dos organismos (Tabela 9.1).

ESCARRO

Diagnóstico de larvas de *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis* e de ancilostomídeos, ovos de *Paragonimus westermani*, escólex de *Echinococcus granulosus*, trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba gingivalis*, *Trichomonas tenax*, oocistos de *Cryptosporidium parvum* e o organismo *Pneumocystis carinii* (fungo)[1,6,8].

Os organismos detectados no escarro podem causar pneumonia, pneumonite ou a síndrome de Loeffler, devido à migração das larvas de *A. lumbricoides*, *S. stercoralis* e ancilostomídeos. O homem é freqüentemente infectado por nematóides, cujos estágios de larva habitualmente realizam migrações extra-intestinais; as larvas de *A. lumbricoides* (de segundo e terceiro estádios) ou de ancilostomídeos (de terceiro estádio) são even-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

tualmente encontradas no escarro. Infecções humanas pelo *P. westermani* ou por outras espécies desse gênero ocorrem na África, Ásia e América Latina, sendo diagnosticadas pelo encontro dos ovos no escarro, como também nas fezes. Nessas infecções o escarro é freqüentemente viscoso, tingido com sangue e com manchas marrons. As manchas são aglomerações de ovos do *P. westermani* de cor marrom-amarelado. Nos casos de autoinfecção interna pelo *S. stercoralis*, quando grande número de larvas de terceiro estádio estão migrando através dos tecidos, esses organismos são identificados no escarro. Outros parasitos raramente ocorrem no escarro. Nos casos de abscesso hepático amebiano os organismos chegam aos pulmões através do diafragma, entrando pelos brônquios, sendo os trofozoítos da *E. histolytica* encontrados no escarro. Quando o escarro é examinado através do exame direto a fresco, habitantes da cavidade bucal ocasionalmente são identificados como trofozoítos não-patogênicos da ameba comensal *E. gingivalis* ou trofozoítos do flagelado *T. tenax*. Os trofozoítos da *E. gingivalis* devem ser corretamente diferenciados da *E. histolytica*. A *E. gingivalis* fagocita leucócitos polimorfonucleares, enquanto a *E. histolytica* apresenta hemácias no citoplasma. Em pacientes portadores da hidatidose, ocasionalmente são encontrados no escarro escólex do *E. granulosus* devido ao rompimento do cisto hidático.

Escarro Expectorado: Exame Direto a Fresco e Preparações Permanentes Coradas

Os parasitos dos pulmões, organismos grandes e móveis são detectados pelo exame direto a fresco. Os esfregaços são examinados com ou sem a adição da solução de iodo de Lugol ou de D'Antoni. A coloração pelo tricrômico é usada para diferenciar a *E. histolytica* da *E. gingivalis* e a coloração de Giemsa é indicada para definir os estágios de larva dos vermes. O *C. parvum* é dificilmente identificado através do exame direto a fresco, sendo a criptosporidiose pulmonar diagnosticada pelo emprego de esfregaços permanentes corados pelos derivados de Ziehl-Neelsen (métodos a quente e/ou a frio)[2,3].

Reagentes

1. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
2. Solução de hidróxido de sódio a 3% (NaOH) agente mucolítico
3. Soluções de iodo (ver p. 38)
   a. Solução de iodo de Lugol
   b. Solução de iodo de D'Antoni
4. Coloração do tricrômico (ver p. 100)
   a. Fixador de Schaudinn (ver p. 11)
   b. Fixador APV (ver p. 14)
   c. Solução de formaldeído a 10% (ver p. 9)
   d. Corante do tricrômico

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

5. Coloração de Giemsa (ver p. 296)
   a. Corante de Giemsa
   b. Solução tampão de fosfato, pH 6,8 a 7,2
   c. Solução triton tamponada a 0,01% (v/v)

Colheita, Amostra e Preparação

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. O escarro colhido para a pesquisa e diagnóstico de parasitos deve representar uma amostra profunda, incluindo o material do trato respiratório inferior, o qual é mais apropriado do que a amostra superficial, constituída principalmente pela saliva. Para garantir uma boa amostra, colher cedo pela manhã, após o paciente ter lavado a boca com peróxido de hidrogênio (água oxigenada).

3. Transportar o espécime ao laboratório, imediatamente após a colheita, em recipiente limpo e com tampa. Selecionar as áreas mucosas tingidas pelo sangue.

4. Quando o espécime apresentar viscosidade uniforme, a seguinte rotina deve se observada após o exame macroscópico:

a. Colocar cerca de 1ml de escarro em tubo cônico de centrífuga de 15ml.

b. Quando o material é viscoso, adicionar igual volume de hidróxido de sódio a 3%.

c. Deixar a suspensão em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos.

d. Adicionar 2ml de solução tampão de fosfato (pH 6,8 ou 0,067M).

e. Centrifugar (1.000 x *g*/5min).

f. Decantar o sobrenadante. Usar o sedimento para o exame direto a fresco e a preparação de esfregaços permanentes corados.

g. Quando o material não pode ser examinado imediatamente após a colheita, preservá-lo com formaldeído a 10%, ou se houver suspeita de protozoários, fixar o espécime pelo APV fixador.

Controle de Qualidade (CQ)

1. As soluções salina e de iodo devem ser controladas, diariamente, no momento do uso. A solução salina deve estar clara, sem evidente contaminação por bactérias e fungos. A solução de iodo deverá apresentar cor marrom forte (chá-da-índia ou vinho do Porto). Desprezar as soluções fracas.

2. A solução de hidróxido de sódio a 3% deve estar clara e livre de contaminação. Preparar nova solução de trabalho quando estiver turva.

3. Ver p. 21 CQ dos preservadores.

4. Cada novo lote da solução do corante de Giemsa a 5% ou do tampão de fosfato, pH 7,2, deve ser controlado pela coloração de uma amostra

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

sangüínea, na qual os glóbulos vermelhos apresentam cor cinzenta, enquanto núcleo e citoplasma dos leucócitos, a coloração vermelho-púrpura e azul, respectivamente.

5. O microscópio e a centrífuga devem ser calibrados a cada 12 meses.

6. Manter a temperatura do refrigerador em 4°C (variação: 2 a 8°C), local onde a solução mucolítica de trabalho será estocada.

7. Estocar as soluções corantes no escuro e a solução concentrada de Giemsa em frasco de vidro com tampa esmerilhada. A fixação e a coloração são usualmente realizadas na cuba de *Coplin*. A solução corante de Giemsa deve ser preparada fresca diariamente.

8. Todos os dados obtidos no CQ devem ser registrados[2,3].

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colher escarro expectorado (não tratado com o agente mucolítico).

a. Com uma pipeta de Pasteur, colocar uma ou duas gotas (50µl) de escarro em uma extremidade de uma lâmina de microscopia, cobrindo-a com uma lamínula (22 x 22mm).

b. Colocar uma segunda gota de escarro na outra extremidade e adicionar uma gota de solução salina a 0,85% cobrindo a preparação com uma lamínula (22 x 22mm).

3. Remover uma pequena porção do escarro não tratado e ressuspender em 100ml de salina, cobrindo a suspensão com uma lamínula.

4. Examinar a preparação salina ao microscópio com pequena intensidade luminosa e objetiva de 10X, para a identificação de ovos, larvas, oocistos e trofozoítos de amebas.

5. Quando os resultados forem inconclusivos, preparar esfregaços permanentes corados:

a. Colocar no centro de três lâminas de microscopia uma pequena gota do sedimento do escarro. Com a ponta de uma lâmina e com movimentos circulares, contínuos, criar uma área de aproximadamente 2cm de diâmetro.

b. Fixar uma lâmina, ainda úmida, no líquido de Schaudinn e deixar as outras duas preparações secarem à temperatura ambiente.

c. Corar o esfregaço fixado em Schaudinn pelo método do tricrômico (ver p. 100).

d. Fixar os outros dois esfregaços estirados com álcool metílico. Corar, respectivamente, um esfregaço com a solução de Giemsa (ver p. 296) e o outro com um dos corantes derivados de Ziehl-Neelsen (ver p. 232).

6. Examinar os esfregaços com objetiva de imersão (100X).

Observações

1. As larvas de helmintos são mais facilmente identificadas no exame direto a fresco, sem coloração e/ou coradas pela solução de iodo de Lugol ou de D'Antoni.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Os trofozoítos de protozoários são geralmente identificados através dos esfregaços permanentes corados pelo tricrômico, enquanto que os oocistos são diagnosticados através de preparações coradas pelos derivados de Ziehl-Neelsen.

3. Quando existe suspeita de oocistos de *C. parvum*, centrifugar o escarro (500 x *g*/10min). Caso contrário, os oocistos não serão encontrados no sedimento usado para a preparação de esfregaços corados.

ASPIRADOS

O exame do material de aspirados e de broncoscopia para o diagnóstico das infecções parasitárias é extremamente valioso quando os exames laboratoriais de rotina não foram conclusivos e eficientes para a demonstração dos organismos. Os aspirados mais comumente processados no laboratório de Parasitologia incluem o aspirado pela fibroscopia e o aspirado duodenal. Os aspirados incluem amostras líquidas coletadas de diferentes sítios anatômicos. A técnica mais rápida e segura para colheita do material pulmonar e que mais freqüentemente conduz ao diagnóstico, é a do lavado broncoalveolar (LBA), através de fibroscopia[3,4]. Os diferentes espécimes devem ser transportados imediatamente após a colheita ao laboratório. Os organismos nunca devem ser identificados tomando como referência somente uma preparação direta a fresco, esfregaços com coloração permanente deverão ser examinados para que sejam estabelecidas a caracterização morfológica e a identificação específica do organismo em estudo[1,4,6].

Aspirado pela fibroscopia: quando os espécimes são colhidos e enviados ao laboratório para a preparação de esfregaços permanentes corados, os seguintes métodos de coloração são indicados para a coloração e diagnóstico dos diferentes parasitos: Giemsa ou Leishmann para *Toxoplasma gondii*, hematoxilina férrica ou tricrômico para amebas, solução de nitrato de prata-metenamina para *P. carinii* (fungo), colorações derivadas de Ziehl-Neelsen para *C. parvum* e tricrômico modificado para microsporídios[4].

Aspirado de cistos e abscessos: a pesquisa de amebas em aspirados requer a concentração pela centrifugação, digestão (estreptoquinase), exame direto a fresco para a pesquisa de organismos móveis, exame cultural e o estudo microscópico das preparações coradas, pela hematoxilina férrica ou pelo tricrômico[4].

Aspirado duodenal: o estudo do líquido duodenal é um procedimento que revela com freqüência organismos como S. *stercoralis*, *G. lamblia* e *C. parvum*, quando o exame parasitológico das fezes é negativo. O aspirado deve ser concentrado pela centrifugação antes do exame direto a fresco para a pesquisa de organismos móveis e da preparação de esfregaços permanentes corados (ver Capítulo 8)[4].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Aspirado da medula óssea: no aspirado são evidenciadas as formas amastigotas da *Leishmania* spp., geralmente intracelulares, do *Trypanosoma cruzi* e do *Plasmodium* spp. Esses parasitos podem ser visualizados através do exame de preparações permanentes coradas pela coloração de Giemsa, Leishmann ou Wright[4].

Colheita de lavado broncoalveolar: a técnica mais rápida e segura para colheita do material pulmonar e que mais freqüentemente conduz ao diagnóstico da pneumocistose é a do lavado broncoalveolar (LBA) através da fibroscopia. As amostras são usualmente concentradas pela centrifugação antes do exame microscópico de preparações permanentes coradas. Os organismos mais freqüentemente detectados são *P. carinii* (fungo), *T. gondii* e *C. parvum*[4].

Fígado e Pulmão

Diagnóstico de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, *Pneumocystis carinii* (fungo) (ver Capítulo 37) e cisto hidático (*Echinococcus granulosus*)[1,6].

Os exames do aspirado dos abscessos do fígado e dos pulmões podem revelar trofozoítos da *E. histolytica.* O material do aspirado deve ser examinado diretamente através do exame direto a fresco, pela preparação de esfregaços permanentes corados ou pela inoculação em meios de cultura apropriados. Preferencialmente, o material deve ser colhido na margem do abscesso e não no centro da necrose. As amebas ocorrem com maior freqüência na porção esverdeada do material e, com menor freqüência, no aspirado da parede do abscesso. O material colhido do abscesso hepático apresenta dificuldades de manipulação e de preparação. Os organismos não exibem movimentos amebóides característicos por estarem freqüentemente presos ao pus viscoso e/ou aos detritos. A Amoebiasis Research Unit, Durban, África do Sul, recomenda o uso de enzimas proteolíticas para libertar as amebas do material de aspirado. O exame direto a fresco e a preparação de esfregaços permanentes corados são indicados para o exame do material colhido perto da parede do abscesso. Os diferentes espécimes devem ser enviados ao laboratório imediatamente após a colheita. Devido à localização profunda dos cistos hidáticos (*E. granulosus*) nos órgãos, e sendo a biópsia usualmente contra-indicada, os testes imunológicos são usados na confirmação ou exclusão do diagnóstico suspeito pela cintilografia, ultra-sonografia, tomografia ou radiologia. O aspirado (líquido hidático) usualmente contém areia hidática (escólex intactos e/ou degenerados, ganchos e corpúsculos calcários).

Nódulos Linfáticos, Medula Óssea e Baço

Diagnóstico de *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Leishmania donovani* e *Toxoplasma gondii*[1,6].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

O exame do aspirado de nódulos linfáticos, medula óssea e baço conduz ao diagnóstico do *T.* (*b*) *gambiense*, *T.* (*b*) *rhodesiense* e *L. donovani*. O material colhido de nódulos linfáticos, medula óssea e baço pode ser examinado através do exame direto a fresco para a identificação das formas tripomastigotas móveis na fase aguda das tripanossomíases africanas. Esfregaços permanentes, preparados com o material colhido dos nódulos linfáticos, fixados pelo álcool metílico e corados pelo método de Giemsa são indicados para a identificação das formas tripomastigotas. A *L. donovani* (complexo) pode ser visualizada nos tecidos do sistema reticuloendotelial onde se incluem baço, medula óssea, linfonodos (além do fígado, mucosa intestinal e sangue periférico), através do exame direto a fresco e pelo exame de preparações permanentes coradas por diferentes métodos de coloração (Giemsa, Leishmann ou Wright). O material colhido pelo aspirado da medula óssea ou do baço pode ser inoculado em meios de cultura. Esfregaços em lâmina por aposição de material colhido de nódulos linfáticos e corado pelos métodos de Giemsa e/ou Leishmann são indicados para a demonstração da leishmaniose e da toxoplasmose humana.

Úlceras Cutâneas

Diagnóstico de *Leishmania* spp. (leishmaniose tegumentar americana)[1,6].

Apesar da ampla variedade de formas clínicas encontradas em pacientes com leishmaniose tegumentar americana (LTA), esta é agrupada em três tipos básicos: leshmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutaneomucosa (LCM) e leishmaniose cutânea difusa (LCD). As formas amastigotas da leishmaniose são demonstradas pelo exame de esfregaços permanentes corados de preparados histopatológicos de biópsias das bordas das úlceras, corados pelos métodos de Giemsa, Leishmann e/ou Wright. O material não deve ser colhido da superfície ou das áreas necróticas da úlcera (ver Capítulo 14).

Biópsia ou Curetagem nas Bordas das Lesões

Observações

1. Fazer biópsia ou curetagem nas bordas das lesões.

2. Retirar um fragmento com o qual é feito esfregaço em lâmina por aposição, e corar pelo método de Giemsa e/ou Leishmann (o material colhido é pressionado entre duas lâminas, formando-se o esfregaço quando as lâminas são separadas).

3. Deixar secar à temperatura ambiente e corar como os esfregaços estirados sangüíneos.

4. Uma porção do material colhido poderá ser inoculada em meios de cultura apropriados (ver Capítulo 14)[5].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Líquido Cefalorraquidiano

Diagnóstico de amebas de vida livre (*Naegleria fowleri* e *Acantamoeba* spp.) tripanossomos africanos (*Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense*) e larvas de *Angiostrongylus cantonensis*[1,6,8] (ver Capítulos 13, 17 e 21)[1,6].

O primeiro caso de meningoencefalite humana causada por ameba de vida livre foi diagnosticado *(post mortem*) e descrito, em 1967, na Austrália. A partir daí numerosos casos fatais foram diagnosticados nos mais diversos países: Austrália, Bélgica, República Tcheca, Inglaterra, Índia, Nova Guiné, Nova Zelândia, Nigéria, EUA, Panamá, Porto Rico, Venezuela e Brasil. Essas amebas são freqüentemente encontradas no solo e na água de lagos e rios.

As formas trofozoíticas são ativas e alimentam-se de bactérias; os cistos são encontrados no solo seco ou na poeira. A *N. fowleri*, comum em lagos e brejos, apresenta em certos períodos de seu ciclo de vida livre formas flageladas. Estas entrariam em contato mais facilmente com os banhistas. Já as espécies *Acanthamoeba* não apresentam formas flageladas, o que explica o menor número de casos humanos provocados por essas últimas amebas. As formas flageladas movem-se ativamente na água e, ao entrarem em contato com a mucosa nasal, transformam-se em trofozoítos ativos; daí, via epitélio neuroolfativo, atingem o cérebro, onde se disseminam por via sangüínea.

A meningoencefalite é rara; entretanto, o exame do líquido cefalorraquidiano pode revelar amebas, usualmente, *N. fowleri.* Para a identificação do organismo colocar uma ou duas gotas do sedimento não centrifugado do líquido da espinha entre lâmina e lamínula e pesquisar a presença de amebas móveis; também devem ser preparados esfregaços permanentes corados pelo método de Giemsa e/ou Wright. O exsudato do líquido da espinha deve ser examinado pela microscopia óptica e/ou pela microscopia de contraste de fase. As amebas de vida livre no líquido cefalorraquidiano devem ser diferenciadas de outras células sangüíneas móveis (leucócitos) ou de células de tecidos, as quais são usualmente menores em tamanho. Nos esfregaços permanentes corados do líquido cefalorraquidiano, as amebas são rapidamente identificadas pelas características do núcleo, as quais não possuem cromatina nuclear, apresentando um grande cariossoma. A aparência do líquido da espinha varia de turva a purulenta (com ou sem hemácias), com algumas centenas de leucócitos a um número superior a 20.000 leucócitos (principalmente neutrófilos). A ausência de bactérias nesse tipo de líquido espinhal, chama a atenção da possibilidade de uma meningoencefalite por ameba. Quando o líquido espinhal é colocado em uma câmara de contagem, todos os organismos que sedimentam na base da câmara, tendem a tomar a forma arredondada, por esta razão, é melhor o exame do líquido entre lâmina e lamínula do que em câmara de contagem. Através do exame direto a fresco e pelos esfregaços permanentes corados as formas tripomastigotas são demonstradas nos estágios finais da tripanossomíase africana.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

A meningite eosinofílica é uma infecção zoonótica do homem, transmitida pelo *A. cantonensis*, verme dos pulmões de ratos. Freqüentemente, a aspiração do líquido cerebroespinal determina a etiologia da meningite, pelo encontro de vermes adultos imaturos do parasito no líquido. A presença do verme e de grande número de eosinófilos em esfregaços permanentes corados é indicação de infecção com esse verme.

O material de nódulos linfáticos, baço, fígado, medula óssea, líquido cefalorraquidiano e olhos ou nasofaringe, quando é examinado para a presença de parasitos, deve ser processado da maneira a seguir.

Líquido Cefalorraquidiano Colhido por Aspiração

Observações

1. Colocar uma ou duas gotas de solução salina a 0,85% em uma lâmina de microscopia e misturar igual volume de material líquido colhido por aspiração, cobrindo a preparação com uma lamínula.

2. A suspensão não deve ser muito espessa, nem muito diluída. O líquido cefalorraquidiano não deve ser diluído antes do exame.

3. Examinar a preparação salina com os aumentos de 100X e 400X para a presença de organismos móveis.

EXAME DOS TECIDOS

As amostras de tecidos, colhidas para a identificação de parasitos, são enviadas ao laboratório em diferentes formas: a) espécimes frescos, material de biópsias usado para o exame direto a fresco; b) preparações prensadas; c) esfregaços em lâmina por aposição, e d) tecidos triturados para a semeadura em meios de cultura apropriados ou para a inoculação em animais de experimentação. O material de biópsia ou tecidos removidos durante cirurgia ou em necrópsia podem ser fixados e examinados através de colorações histológicas.

Pele

Diagnóstico de *Leishmania* spp. (leishmaniose tegumentar americana), *Entamoeba histolytica* (amebíase secundária), *Acanthamoeba* spp. (amebíase primária), microfilária de *Onchocerca volvulus* e microfilária de *Mansonella streptocerca*[1,6,7] (ver Capítulos 14, 18, 19 e 21).

Fragmentos de pele com suspeita de parasitismo por leishmania ou ameba podem ser fixados, processados e corados como os outros espécimes de tecidos. Para o diagnóstico da leishmaniose cutânea e mucocutânea, após a anestesia local, fazer biópsia ou curetagem nas bordas da lesão. Retirar um fragmento com o qual é feito o esfregaço em lâmina por aposição, corado pelos métodos de Giemsa ou Leishmann. A cultura é realizada a partir de frag-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

mentos do tecido triturado inoculado no meio de cultivo MacNeal, Novy e Nicolle (NNN) associado ao meio LIT (*Liver Infusion Triptose*). O método de escolha para o diagnóstico das infecções humanas com *O. volvulus* e *M. streptocerca* é o uso de pedaços superficiais da pele. As microfilárias de ambas as espécies ocorrem principalmente na pele; entretanto, a microfilária *O. volvulus* em raras ocasiões é encontrada no sangue e ocasionalmente na urina. Os melhores resultados são obtidos pela retirada de um fragmento superficial de pele (retalho cutâneo) na região do corpo mais afetada. As microfilárias da *O. volvulus* podem estar nos capilares sangüíneos do retalho cutâneo, dificultando o diagnóstico[1]. O diagnóstico da amebíase cutânea pode ser realizado pela retirada de fragmentos cutâneos da pele e subseqüente coloração pelo método da hematoxilina-eosina (HE).

Método do Fragmento Superficial da Pele (Retalho Cutâneo)

Reagentes

1. Solução salina fisiológica a 0,85% (ver p. 35)
2. Corante de Giemsa (ver p. 296)
3. Álcool metílico absoluto, livre de acetona (CH_4O)

Método

1. Em uma lâmina de microscopia colocar o fragmento da pele e uma ou duas gotas de solução salina a 0,85%, cobrindo a preparação com uma lamínula ou com uma placa de Petri para prevenir a evaporação.

2. Examinar a preparação depois de 30 a 60 minutos. As microfilárias abandonam o fragmento de pele, sendo vistas ao microscópio movimentando-se ativamente. De preferência, a observação deverá ser realizada com aumentos de 10X, ou em microscópio de dissecação.

3. Deixar o líquido que contém as filárias secar à temperatura ambiente. Fixar a preparação com álcool metílico absoluto e corar pelo método de Giemsa. As microfilárias devem ser estudadas para que seja estabelecida a caracterização morfológica e a identificação específica dos organismos, para o diagnóstico diferencial entre *O. volvulus* e *M. streptocerca* (ver Capítulos 18 e 19).

Tecidos Muscular e Subcutâneo

Diagnóstico de larvas de *Trichinella spiralis*, vermes adultos de *Onchocerca volvulus*, vermes adultos de *Mansonella streptocerca*[1,6].

A triquinelose humana é geralmente diagnosticada pela observação clínica da sintomatologia, pelo estudo epidemiológico do consumo dos alimentos e pelos testes imunológicos. Entretanto, freqüentemente a confirmação da infecção é realizada pela demonstração direta das larvas nos tecidos. A

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

presença das larvas nos tecidos é demonstrada de três maneiras: a) comprimir um pequeno pedaço de músculo fresco entre duas lâminas de microscopia e examinar ao microscópio com pequeno aumento, ou em microscópio de dissecação; b) digestão do tecido fresco para libertar a larva, e c) demonstração da larva através de corte histológico do músculo. Os tecidos musculares que mais freqüentemente contêm a larva são a língua, músculo masseter e outros tecidos musculares metabolicamente ativos.

Reto e Bexiga

Diagnóstico de ovos de *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma haematobium*[1,6].

Devido às dificuldades em demonstrar ovos de *S. mansoni* e de *S. japonicum* em infecções leves e em crônicas antigas, o exame do material de biópsia do reto é indicado para o diagnóstico da esquistossomose intestinal e japônica. A biópsia retal foi proposta como técnica de diagnóstico anatomopatológico da esquistossomose, em 1943, tendo sido, posteriormente, padronizada para permitir análise mais precisa da atividade da infecção por diferentes equistossomas. A retirada de pequeno fragmento da mucosa retal, na altura das válvulas de Houston, permite o diagnóstico da esquistossomose mansônica, por meio da identificação dos ovos do trematódeo com maior freqüência do que quando se utiliza apenas um exame coproscópico pela técnica da sedimentação espontânea ou de Kato-Katz. A biópsia retal tem sido utilizada apenas na avaliação da atividade de drogas antiesquistossomas.

O exame do tecido da mucosa da bexiga pode revelar ovos de *S. haematobium* quando os ovos não podem ser demonstrados na urina. Em biópsia do reto, a viabilidade dos ovos pode ser demonstrada pelo estudo dos miracídios presentes nos ovos.

Raspados e Material de Biópsia da Córnea

Método de coloração para o diagnóstico da ceratite pela *Acanthamoeba* spp.[1,6].

Esse método foi desenvolvido para a coloração de esfregaços para o diagnóstico de ceratite, uveíte e ulcerações da córnea que estão associadas com a *Acanthamoeba* spp. O diagnóstico rápido da ceratite envolve o uso de *calcofluor* branco, corante quimiofluorescente (Fluorescent Brightener 28 — Sigma), com afinidade para polímeros polissacarídicos dos cistos da ameba. Este método mostrou ser um procedimento excelente para o exame de raspados e de material de biópsia da córnea (ver Capítulo 21).

Reagentes

1. Álcool metílico absoluto (CH_4O), livre de acetona

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Solução corante	
Calcofluor branco ($C_{40}H_{44}N_{12}O_{10}S_2$)	0,1g
Azul de Evans (CI 23860) ($C_{34}H_{24}N_6O_{14}S_4Na_4$)	0,1ml
Água destilada-deionizada	100ml

Tabela 9.1
Colorações para a Identificação de Parasitos de Diferentes Tecidos (Esfregaços Preparados por Aposição)

Tecido	*Provável Parasito*	*Corante*
Pulmões	*Pneumocystis carinii* (classificado como fungo)	Giemsa, nitrato de prata metenamina, *calcofluor*, reagentes imunoespecíficos
	Microsporídios	Tricrômico modificado (coloração de Gram + *Chromotrope*), ME
	Toxoplasma gondii	Giemsa, reagentes imunoespecíficos
	Cryptosporidium parvum	Colorações derivadas de Ziehl-Neelsen*
Fígado	*Toxoplasma gondii*	Giemsa
	Leishmania donovani	Giemsa
	Cryptosporidium parvum	Colorações derivadas de Ziehl-Neelsen, reagentes imunoespecíficos
Cérebro	*Naegleria* sp.	Giemsa e tricrômico
	Acanthamoeba sp.	Giemsa e tricrômico
	Balamuthia mandrillaris	Giemsa e tricrômico
	Entamoeba histolytica	Giemsa e tricrômico
	Toxoplasma gondii	Giemsa e reagente imunoespecífico
	Microscoporídios (*Encephalitozoon* sp.)	Tricrômico modificado (coloração de Gram + *Chromotrope*), ME
Pele	*Leishmania* spp.	Giemsa
	Onchocerca volvulus	Giemsa
	Mansonella streptocerca	Giemsa
	Acanthamoeba sp.	Giemsa e tricrômico
Nasofaringe, cavidade sinovial	Microsporídios	Tricrômico modificado (coloração de Gram + *Chromotrope*), ME
	Acanthamoeba sp.	Giemsa e tricrômico
	Naegleria sp.	Giemsa e tricrômico
Intestino		
Intestino delgado	*Cryptosporidium parvum* (também no intestino grosso)	Colorações derivadas de Ziehl-Neelsen, reagentes imunoespecíficos
Jejuno	Microsporídios (*Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*)	Tricrômico modificado (coloração de Gram + *Chromotrope*), ME
Duodeno	*Giardia lamblia*	Giemsa e tricrômico
Cólon	*Entamoeba histolytica*	Giemsa e tricrômico
Córnea, conjuntiva	Vários gêneros de microsporídios	Tricrômico modificado (coloração de Gram + *Chromotrope*), ME
	Acanthamoeba sp.	Giemsa, tricrômico e *calcofluor* para cistos
Músculos	*Trichinella spiralis*	Exame direto a fresco, preparação por aposição
	Microsporídios (*Plestophora* sp.)	Tricrômico modificado (coloração de Gram + *Chromotrope*), ME

Adaptado: Garcia e Bruckner[6]; ME = microscopia eletrônica; *Colorações pelos derivados de Ziehl-Neelsen = *acid fast stain*.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colocar em lâmina de microscopia o material colhido do raspado da córnea. Deixar secar à temperatura ambiente.

3. Fixar o esfregaço com álcool metílico absoluto durante três a cinco minutos.

4. Corar o esfregaço durante cinco minutos com a solução corante.

5. Virar as lâminas sobre uma toalha de papel, para que o excesso do corante seja retirado.

6. Cobrir os esfregaços com lamínula e examinar através da microscopia de fluorescência. Os cistos da ameba apresentam a coloração quimiofluorescente azul-claro (os trofozoítos não são corados).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ash LR, Oriehl TC. Parasites: a guide to laboratory procedures and identification. Chicago (Ill): ASCP Press, 1991.
2. Barlett MS. Expectorated sputum: Direct and stained preparations. In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.7.1.1-7.7.1.4. v.2, 1992.
3. Barlett MS. Indiced sputum: Stained preparation for detection of *Pneumocystis carinii*. In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.7.2.1-7.7.2.8. v.2, 1992.
4. Barlett MS. Aspirates and bronchospy specimes. In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.7.3.1-7.7.3.6. v.2, 1992.
5. Barlett MS. Biopsy specimens. In: Insenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.7.4.1-7.7.4.7. v.2, 1992.
6. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3nd ed. Washington (DC): ASM Press, 1997.
7. Gerusa D, Rocha A. Filariose bancroftiana. In: Ferreira AW, Ávila SLM eds. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,195-200, 1996.
8. Melvin DM, Brooke MM. Laboratory procedures for the diagnosis of intestinal parasites. 3rd ed. HHS publication N.º (CDC)82-8282. Atlanta: Laboratory Training and Consultation Division, Centers for Disease Control, 1982.

BIBLIOGRAFIA ADICIONAL

1. Bogisth BJ. Human Parasitology. 2nd ed. Academic Press San Diego, 1998.
2. Cox FEG, Kreier J, Wakelin D eds. Parasitology. 9th ed. Arnold: London, v.5, 1998.
3. Garcia LS. Practical Guide to Diagnostic Parasitology. Washington (DC): ASM Press, 1999.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

4. Markell EK, John DT, Krotoski, WA. Markell and Voge's Medical parasitology. 8th ed. Philadelphia: WB Saunders Co., 1999.

5. Sun T. Parasitic Disorders. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999.

6. Wittner M. ed. The Microsporidia and Microsporidiosis. Washington, DC: ASM Press, 1999.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte



SEÇÃO 3

Parasitos Emergentes e Oportunistas

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Capítulo 10



Métodos de Coloração para Coccídios Intestinais

Geraldo Attilio De Carli
Hércules Moura

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os coccídios intestinais dos gêneros *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Isospora* e *Sarcocystis* são parasitos intracelulares obrigatórios que habitam a mucosa do intestino delgado do homem. Os gêneros *Cryptosporidium* e *Cyclospora* constituem dois grupos de protozoários parasitos, responsáveis por gastroenterite transitória. A criptosporidiose é uma antropozoonose, muito bem conhecida pelos veterinários, que veio fazer parte da patologia humana, causando problemas graves e prolongados em imunodeficientes, notadamente em doentes acometidos pela síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS). As manifestações da criptosporidiose podem ser agrupadas em dois tipos, dependendo do estado do portador: gastroenterite transitória em pacientes imunocompetentes, e manifestações persistentes, com sinais e sintomas clínicos marcados em pacientes imunodeprimidos[29]. O gênero *Cyclospora* encontrado nas fezes de pacientes imunodeprimidos[29], de aidéticos e de viajantes provenientes de países em desenvolvimento e/ou de regiões tropicais tem sido caracterizado por moderada à severa fadiga, náuseas, anorexia, mialgia, perda de peso e intensa diarréia. Durante os últimos anos, a ciclosporose tem sido descrita em vários surtos de diarréia nas Américas Central e do Sul, no Caribe, na África, em Bangladesh, no sul e oeste da Ásia, na Austrália, na Inglaterra e na Europa oriental. As rotas de transmissão da ciclosporose ainda são desconhecidas; e, provavelmente, a principal

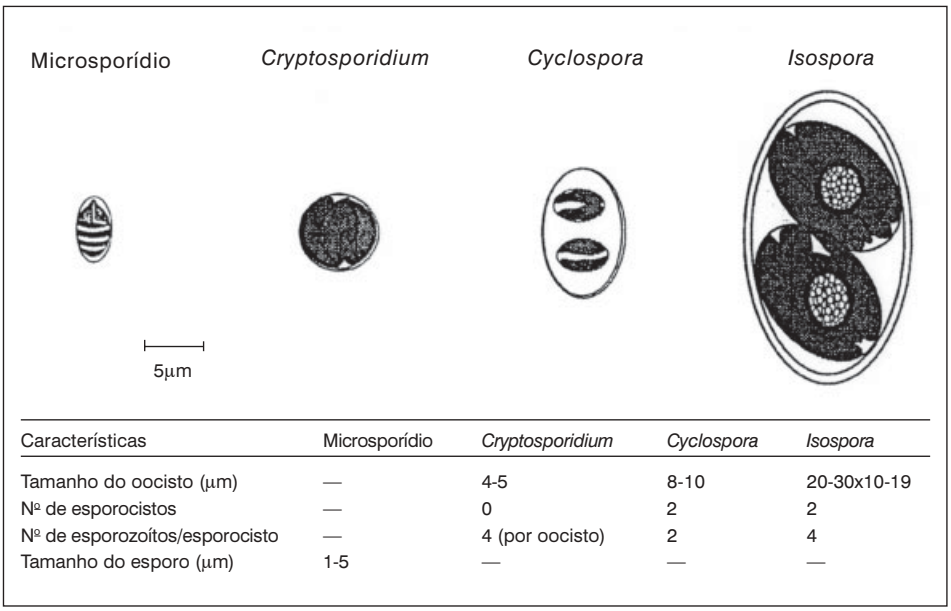
© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

é a fecal-oral, diretamente e, ou via água. A infecção por *I. belli* ou isosporose tem sido diagnosticada em pacientes com SIDA/AIDS. A maioria dos protozoários intestinais é transmitida através da contaminação fecal dos alimentos e líquidos. Entretanto, o homem é infectado pelo *Sarcocystis hominis* e pelo *Sarcocystis suihominis* pela ingestão, respectiva, de carne de bovinos ou de suínos, crua ou malcozida, contaminada com sarcocistos maduros contendo bradizoítos. As infecções pelo gênero *Sarcocystis* ocorre em uma variedade de hospedeiros, incluindo o homem. A sarcocistose não é uma doença muito bem conhecida no homem. Os hospedeiros imunocomprometidos infectados pelas espécies *S. hominis* e *S. suihominis* apresentam febre, diarréia grave, dor abdominal e perda de peso. Os oocistos maduros e os esporocistos livres desses coccídios são transparentes e de difícil visualização em esfregaços não corados, necessitando de coloração especial para serem identificados. A morfologia dessas formas é similar. Os estágios de diagnóstico (oocistos) dos coccídios são diferenciados pelo tamanho e a morfologia deve ser cuidadosamente examinada pela microscopia óptica. Os oocistos podem não conter o esporocisto (como o *Cryptosporidium*), mas todas as espécies possuem as formas de esporozoítos. A morfologia comparada entre os estágios de diagnóstico dos microsporídios e dos coccídios é apresentada na forma de diagrama na Fig. 10.1.

CRYPTOSPORIDIUM PARVUM

Até 1978, os oocistos do *Cryptosporidium* spp. não eram pesquisados nas fezes dos hospedeiros humanos infectados. Conseqüentemente, o diagnóstico biológico dependia da evidenciação histológica desse organismo nos tecidos. Métodos e técnicas especiais para identificar os oocistos nas fezes



Características	Microsporídio	*Cryptosporidium*	*Cyclospora*	*Isospora*
Tamanho do oocisto (μm)	—	4-5	8-10	20-30x10-19
Nº de esporocistos	—	0	2	2
Nº de esporozoítos/esporocisto	—	4 (por oocisto)	2	4
Tamanho do esporo (μm)	1-5	—	—	—

Fig. 10.1 — *Morfologia comparada entre os estágios de diagnóstico dos microsporídios e coccídios. (Adaptada de Collins R. Protozoan parasites of the intestinal tract: A review of coccidia and microsporidia. JAOA, 10:593-598, 1997.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

de bezerros infectados[1,33] e no homem[2,7,22-24,27,56,58] trouxeram a oportunidade de diagnosticar e monitorar o curso da criptosporidiose com rapidez e acuidade. A presença de oocistos de *C. parvum* nas fezes de pessoas imunodeficientes e a participação evidente do parasito na sintomatologia da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS) exigem do laboratório o conhecimento dos métodos e das técnicas necessárias para um diagnóstico biológico rápido e confiável de uma nova parasitose atribuída a uma protozoose intestinal humana. O diagnóstico definitivo da criptosporidiose baseia-se na demonstração dos oocistos nas fezes. Entretanto, inúmeras dificuldades são encontradas na realização desse diagnóstico (Figs. 10.2 e 10.3).

Nos indivíduos imunocompetentes, os parasitos são identificados nas fezes três dias após a contaminação e o tempo de emissão é curto (duas ou três semanas), não havendo abundância. Nos pacientes imunodeprimidos, a permanência dos oocistos pode ser indefinida, correspondendo aos períodos de diarréia. Esta diarréia aquosa acarreta a diluição dos parasitos e a aceleração das evacuações, com presença de muco e de numerosos restos de vegetais que podem mascarar a pesquisa. A emissão dos oocistos é descontínua, sendo necessária a realização de várias colheitas e exames a cada três dias antes de concluir pela ausência do protozoário. Sendo os parasitos raros, as leveduras, ao contrário, com muita freqüência são abundantes e deverão ser diferenciadas do *Cryptosporidium*, que tem o mesmo tamanho.

Em razão do risco de contaminação do operador, é necessário tomar precauções durante a manipulação (usar luvas durante todas as etapas dos procedimentos de coloração, descontaminar o material e incinerar os resíduos). Quando as fezes forem provenientes de pacientes com SIDA/AIDS, os laboratórios deverão tomar os mesmos cuidados usados para a hepatite. Considerável experiência é requerida com as técnicas de concentração e com os métodos de coloração para a obtenção de um diagnóstico exato. Os métodos de coloração derivados da fucsina-fenicada foram modificados e aperfeiçoados. Os métodos modificados de Ziehl-Neelsen (a quente) e o de

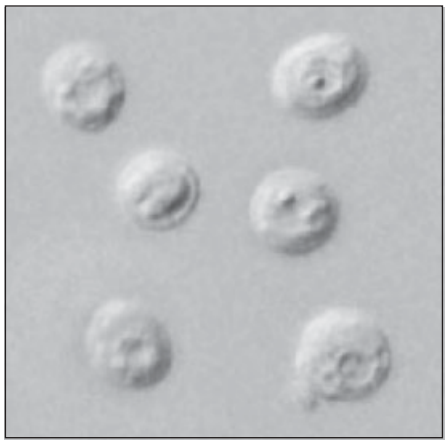


Fig. 10.2 — *Oocistos de* Cryptosporidium parvum*, em exame direto a fresco, pela microscopia de contraste de fase ou do contraste diferencial de interferência (DIC). Os oocistos são arredondados (variando entre 4,2 e 5,4μm de diâmetro). Os esporozoítos são visíveis nos oocistos indicando que ocorreu a esporulação. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

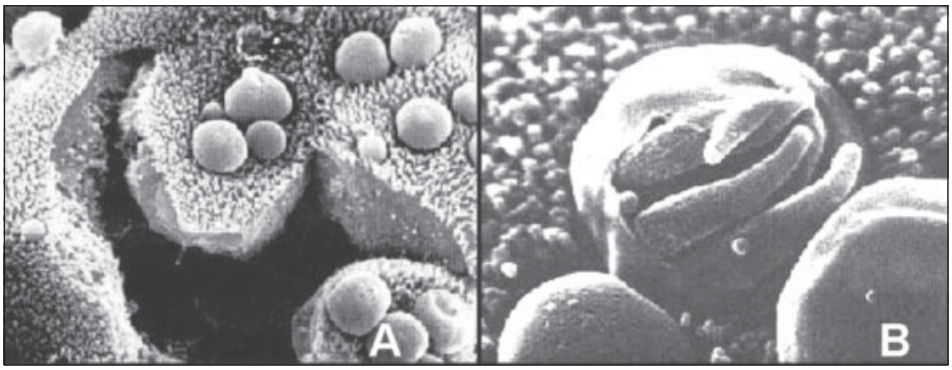


Fig. 10.3 — Cryptosporidium *spp.: A) Mucosa do trato intestinal revestida por oocistos de* Cryptosporidium*; B) Meronte rompido mostrando merozoítos (Microfotografias pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) — Segundo Gardiner et al. An Atlas of Protozoa Parasites in Animal Tissues. USDA, Agriculture Handbook n.º 651; 1988 (on line). Disponível em URL: http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasit (1999 Set 3).*

Kinyoun (a frio) foram descritos somente em 1983[27,38]. Modificações adicionais incluíram a incorporação do dimetilsulfóxido (DMSO) à coloração de Ziehl-Neelsen[13,50] e a adição do tergitol à modificação a frio do procedimento de Kinyoun[39]. Uma das vantagens dos métodos derivados de Ziehl-Neelsen é a facilidade de identificação de outros parasitos (p. ex.: *Isospora* e *Cyclospora*) no esfregaço fecal, os quais não seriam diagnosticados através de testes específicos, como a imunofluorescência e/ou a enzima-imunoensaio. Métodos alternativos de microscopia óptica incluem: a coloração negativa[17,22,34,49]; a coloração a quente da safranina-azul-de-metileno[8,9]; a coloração modificada de Kohn[5]; a coloração modificada de Koster[36]; a anilina-carbometil violeta e a tartrazina[40]. Os métodos de coloração pelos fluorocromos incluem: a auramina O[47]; a auramina-rodamina[27,38], a auramina-fucsina-fenicada[16]; alaranjado de acridina[27,38]; a mepacrine[59], a diaminofenilidona (DAPI) e o iodeto de propídio[37]. Os métodos de coloração pelos fluorocromos exibem um potencial de alta sensibilidade, comparável aos métodos derivados da fucsina-fenicada, mas devido à inespecificidade química de todos os métodos de coloração, resultados falso-positivos são freqüentes e numerosos oocistos podem não ser corados. Alguns investigadores utilizam como procedimento de triagem a microscopia de contraste de fase ou do contraste diferencial de interferência (DIC ou Nomarski) para a observação direta de espécimes fecais frescos ou concentrados[4,20,30,57] (Figs.10.4 e 10.5) (Tabelas 10.1 e 10.2).

Cyclospora cayetanensis

A *Cyclospora cayetanensis*, coccídio protista, é um protozoário patogênico para o homem. A ciclosporose é caracterizada por moderada à severa fadiga, náuseas, anorexia, mialgia, perda de peso e intensa diarréia[10,43-45,54]. Os oocistos da *Cyclospora cayetanensis* são excretados de forma intermitente, esporádica e raramente em pequeno número. Os oocistos não são esporulados quando excretados nas fezes, eles necessitam de uma

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

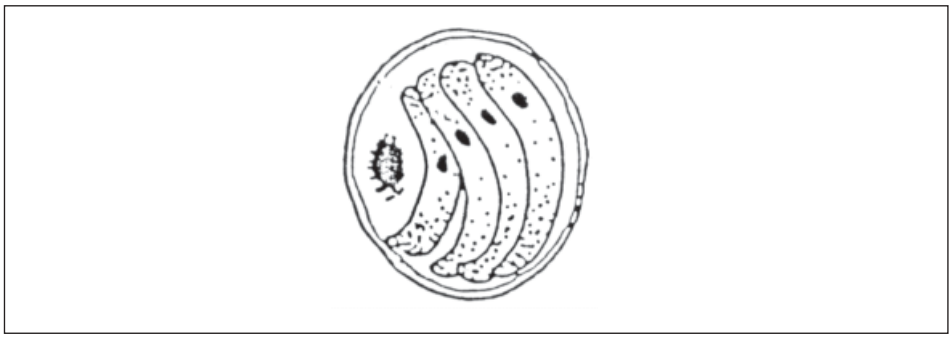


Fig. 10.4 — *Desenho de oocisto de* Criptosporidium *spp*.

a duas semanas em condições ideais de temperatura para se tornarem esporulados. Os oocistos esporulados são arredondados, com 8 a 10µm de diâmetro. Cada oocisto esporulado possui dois esporocistos ovais (4,0 x 6,3µm) e cada esporocisto apresenta dois esporozoítos (1,2 x 9,0µm)[45]. Os oocistos possuem uma evidente e bem definida parede cística e mostram internamente agrupamentos de glóbulos refráteis, rodeados por uma membrana espessa. Esses glóbulos internos coram-se de castanho pela solução de iodo. Os oocistos da *Cyclospora* são duas vezes maiores em tamanho do que os estágios de diagnóstico de *C. parvum* (arredondados, esféricos ou ovais, com 4 a 5µm de diâmetro) e um terço menores do que a *I. belli* (elipsóides, 20 a 30 x 10 a 19µm)[6,45] (Tabelas 10.1 e 10.2). A morfometria com o micrômetro ocular é indispensável para a identificação das espécies[31]. Devido às limitações do exame microscópico de preparações a fresco, vários métodos de coloração favorecem o diagnóstico de *Cyclospora cayetanensis*. Os oocistos de *Cyclospora* são diagnosticados pela coloração de preparações fixadas e coradas pelos derivados de Ziehl-Neelsen[25,39,57], pela safranina modificada[8,60], pela autofluorescência (ação da luz ultravioleta — UV)[12,18] e pela utilização da reação em cadeia da

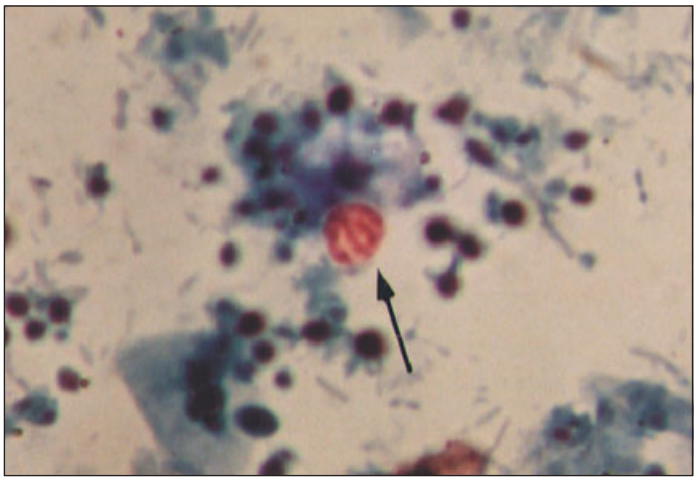


Fig. 10.5 — *Oocisto de* Cryptosporidium parvum *corado pelo método de Ziehl-Neelsen modificado. A seta indica oocisto com quatro esporozoítos. Aumento 1.000X. (Cortesia da Dra. Regina Maura Bueno Franco. Departamento de Parasitologia, IB/UNICAMP, Campinas, SP.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

polimerase (PCR)[48]. As variações da coloração de Ziehl-Neelsen não são tão eficazes para essa espécie como para os outros coccídios intestinais (*C. parvum* e *I. belli)* (Figs. 10.4 e 10.8).

Curiosa e inexplicavelmente, a *Cyclospora* exibe marcada variabilidade de coloração quando corada pelos derivados de Ziehl-Neelsen, mas alguns oocistos não são visualizados. Os oocistos coram-se do rosa ao vermelho, ao púrpura intenso sobre um fundo azul de intensidade de cor variável (Fig. 10.9). Entretanto, os oocistos não apresentam morfologia interna bem definida, mostrando intensidade de cor variável. Essa variabilidade de coloração deixa de ser um problema nas infecções maciças, porque sempre serão observados vários oocistos corados. Foram relatados casos em que todos os oocistos presentes no esfregaço fecal não foram corados[6,25,30].

Em preparações coradas pelos derivados de Ziehl-Neelsen os oocistos são uniformes no tamanho, permanecendo com a mesma grandeza como foram descritos no exame direto a fresco. Entretanto, com mais freqüência do que nas preparações a fresco, os oocistos não são perfeitamente arredondados. A parede dos oocistos apresenta uma típica aparência rugosa ou ondulada e colapso ou distorção em um ou em vários lados[25,30]. Dependendo do grau de coloração, os oocistos podem variar em cor, desde organismos incolores, ou de coloração vermelha clara, a um intenso e brilhante púrpura avermelhado. Essa variabilidade na intensidade de coloração, apesar de ser uma das características da *Cyclospora*, tem indubitavelmente levado a muitos erros no diagnóstico de laboratório[18,19]. Na coloração da hematoxilina férrica modificada pela incorporação do corante de Kinyoun (solução de fucsina-fenicada), os oocistos da *Cyclospora cayetanensis* aparecem arredondados de coloração rosa ao vermelho púrpura sobre um fundo cinza da preparação[46,51,52]. A coloração da safranina, desenvolvida para a identificação de oocistos de *Cryptosporidium* em esfregaços fecais, foi modificada pela inclusão do aquecimento em forno de microondas[8,18,32,60]. A inclusão do aquecimento em forno de microondas ao procedimento de coloração resultou em uma coloração uniforme dos oocistos. Esse procedimento de coloração não é somente superior às colorações derivadas de Ziehl-Neelsen, mas é mais rápido, seguro e de fácil realização. Os oocistos da *Cyclospora cayetanensis* corados pela safranina modificada exibem as seguintes características: tamanho de 8 a 10μm de diâmetro, parede rugosa e a coloração varia do vermelho a um brilhante vermelho-alaranjado. A parede dos oocistos permanece autofluorescente, sendo mais evidente quando é observada pelo microscópio de contraste diferencial de interferência (DIC ou Nomarsky)[30] (Fig.10.9).

A demonstração dos oocistos pelo exame direto a fresco é aumentada ou intensificada pela microscopia de epifluorescência[12]. Os oocistos exibem marcada autofluorescência, a qual é facilmente observada pelo microscopista. A autofluorescência dos oocistos de *C. parvum* é tão tênue que não exibe valor no diagnóstico desse coccídio. Entretanto, os oocistos de *I. belli* apresentam uma brilhante e visível autofluorescência[6,12,30,57]. Os oocistos da *Cyclospora* autofluorescem em verde forte (filtro de excitação de 450 a 490 DM) ou em azul intenso (filtro de excitação de 365DM), quando submetidos à ação da luz ultravioleta (UV). A fluorescência inespecífica é re-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

duzida pela adição de uma gota de solução de iodo de D'Antoni antes do exame. As amostras fecais frescas fixadas pelo álcool metílico ou preservadas pelo SAF são usadas na microscopia de fluorescência pela luz ultravioleta (UV) (Figs. 10.7 e 10.9) (Tabelas 10.1 e 10.2).

Os oocistos não se coram pelo tricrômico, mas aparecem como esferas torcidas, claras, pálidas e arredondadas, como também não se coram pela hematoxilina férrica, Grocott-Gomori, prata-metenamina, iodo ou ácido periódico de Schiff (PAS)[30,60].

Isospora belli

A infecção pela *I. belli*, ou isosporose, tem sido diagnosticada em pacientes com SIDA/AIDS. Os sintomas incluem diarréia, náuseas, febre, cefaléia e perda de peso. A doença pode persistir por meses ou anos. Em preparações fixadas e coradas, o oocisto é tipicamente elipsóide, medindo em média 20 a 30µm de comprimento e 10 a 19µm de largura, com as extremidades afuniladas (regiões polares), apresentando uma dupla parede lisa e hialina (Tabelas 10.1 e 10.2). Quando excretados nas fezes, os oocistos são imaturos (não esporulados) contendo um esporoblasto. Depois da excreção os oocistos maduros dividem-se formando dois esporoblastos. Os esporoblastos segregam cada qual uma membrana resistente em torno de si, transformando-se em esporocistos, com quatro esporozoítos dentro de cada um. Os oocistos da *I. belli* são diagnosticados pelo exame direto a fresco, pela coloração de preparações fixadas e coradas pelos derivados de Ziehl-Neelsen, pela microscopia de contraste diferencial de interferência (DIC ou Nomarsky) e pela epifluorescência. Os oocistos autofluorescem em azul intenso (filtro de excitação de 330 a 380 DM) quando submetidos à ação da luz ultravioleta (UV)[6,11,30] (Figs.10.7 e 10.8).

MÉTODOS DE COLORAÇÃO

Os métodos recomendados para a coloração de oocistos de *C. parvum*, *Cyclospora cayetanensis* e *I. belli* não são indicados para amostras fecais preservadas pelo fixador álcool-polivinílico (fixador APV). As colorações de rotina, como tricrômico e hematoxilina férrica, não apresentam bons resul-

Tabela 10.1
Coccídios Intestinais Humanos: Estágio de Diagnóstico, Forma e Tamanho

Espécie	*Estágio de Diagnóstico*	*Forma*	*Tamanho (µm)*
Cryptosporidium parvum	Oocisto	Esférico ou oval	3-6 (média 4-5)
Cyclospora cayetanensis	Oocisto	Esférico	8-9 (média 8-10)
Isospora belli	Oocisto	Elipsóide	20-30 x 10-19
Sarcocystis	Esporocisto	Ovóide	9-16 x 7,5-12
S. hominis			(15-19 x 15-20)
S. *suihominis*			

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

tados na identificação destes coccídios. A coloração de Ziehl-Neelsen e suas variações são os procedimentos que oferecem os melhores resultados (Fig. 10.4) (Tabela 10.3).

Nota: Colorações derivadas de Ziehl-Neelsen = *acid fast stain*.

Método de Henriksen-Pohlenz

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas) ou sedimento concentrado de fezes frescas ou preservadas em solução salina de formaldeído a 10%. Outras amostras, como conteúdo duodenal, biliar e pulmonar (escarro, lavado broncoalveolar e material de biópsia) favorecem com freqüência a coloração e o diagnóstico de oocistos das espécies *C. parvum* e *I. belli*.

Reagentes

1. Álcool metílico (CH_4O)
2. Álcool etílico (C_2H_6O)
3. Fucsina básica (CI 42500) ($C_{19}H_{19}N_3O$)
4. Fenol (fundido a 44°C) (C_6H_6O)
5. Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)
6. Verde de malaquita (CI 42000) [$(C_{23}H_{25}N_2)_2.3C_2H_2O_4$]
7. Resina sintética (*Cytoseal 60*, Mounting Medium, Low Viscosity)

Preparação das Soluções

1. Corante de Kinyoun (solução de fucsina-fenicada)

a. Solução A

Fucsina básica	1,5g
Álcool etílico a 95% (v/v)	100ml

b. Solução B

Fenol (fundido a 44°C)	5g
Água destilada-deionizada q.s.p.	100ml

c. Solução Corante

Solução A	10ml
Solução B	90ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

• Filtrar a solução e armazenar à temperatura ambiente até o momento do uso. Estável por um ano.

2. Solução Aquosa de Ácido Sulfúrico a 2%

• Armazenar à temperatura ambiente. Estável por um ano.

3. Solução Aquosa de Verde de Malaquita a 5%

• Armazenar à temperatura ambiente. Estável por um ano.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
2. Preparar o esfregaço com fezes frescas ou preservadas.
3. Deixar secar à temperatura ambiente.
4. Fixar com álcool metílico por cinco minutos e deixar secar à temperatura ambiente (cubas de *Coplin* poderão ser usadas nessa fase do processo de coloração).
5. Corar com o corante de Kinyoun (a frio) durante uma hora (cubas de *Coplin* poderão ser usadas nessa fase do processo de coloração).
6. Escorrer o corante e lavar com água corrente.
7. Diferenciar com solução aquosa de ácido sulfúrico a 2%.
8. Lavar com água corrente.
9. Corar o fundo com solução de verde de malaquita a 5% por oito minutos (Cubas de *Coplin* poderão ser usadas nessa fase do processo de coloração).
10. Lavar com água corrente e secar.
11. Montar com resina sintética (*Cytoseal* 60).

Características da Coloração

Os oocistos de *Cryptosporidium* aparecem arredondados com 3 a 5μm, de coloração vermelha intensa e brilhante ou rosa sobre um fundo azul-esverdeado da preparação. A parede é espessa, o citoplasma é finamente granulado com uma zona central clara. Os corpos residuais e os esporozoítos são corados em castanho. As leveduras e as bactérias aparecem uniformemente coradas em azul-esverdeado[24] (Figs. 10.7 e 10.8).

Observações

1. A diferenciação depende do corante, de ensaios preliminares sobre fezes positivas para adaptar a concentração do ácido a ser utilizada e da definição dos tempos de diferenciação.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Current[23] usa a solução aquosa de ácido sulfúrico a 10% na etapa 6 e os corantes *light green* SF *yellowish* (CI 42095) ou azul-de-metileno a 0,3% diluídos em água destilada-deionizada na etapa 8.

3. Outros autores preferem lavar o esfregaço na etapa 7 com álcool etílico a 50% (v/v). Alguns procedimentos usam o método a quente. Entretanto, a coloração a frio apresenta os melhores resultados.

4. O escarro deverá ser tratado com solução de formaldeído a 10% e processado como as amostras fecais.

5. Cubas de *Coplin* deverão ser usadas em todas as etapas do procedimento de coloração.

Método Modificado de Kinyoun (a Frio)

O método de Kinyoun modificado (a frio), não requer o aquecimento da fucsina-fenicada usada na coloração. Esse método é indicado para a coloração de *C. parvum* e *I. belli*. A *Cyclospora cayetanensis* tem sido descrita como ácido-resistente-variável, sendo recomendadas modificações dessa coloração para demonstrar estes organismos[30,38,41,53] (Fig.10.5A) (ver anexo deste Capítulo).

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas) ou sedimento concentrado de fezes frescas ou fezes preservadas em solução salina de formaldeído a 10%. Garcia e Bruckner[30] usam fezes preservadas em SAF. Outras amostras, como conteúdo duodenal, biliar e pulmonar (escarro, lavado broncoalveolar e material de biópsia) favorecem com freqüência a coloração e o diagnóstico dos oocistos das espécies *C. parvum* e *I. belli*.

Reagentes

1. Álcool metílico (CH_4O)
2. Álcool etílico (C_2H_6O)
3. Fucsina básica (CI 42500) ($C_{19}H_{19}N_3O$)
4. Fenol (fundido a 44°C) (C_6H_6O)
5. Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)
6. Verde de malaquita (CI 42000) [$(C_{23}H_{25}N_2)_2.3C_2H_2O_4$]
7. Resina sintética (*Cytoseal* 60)

Preparação das Soluções

1. Corante de Kinyoun (Solução de fucsina-fenicada)

Fucsina básica	4g
Fenol, fundido a 44°C	8ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Álcool etílico a 95% (v/v)	20ml
Água destilada-deionizada q.s.p.	100ml

• Dissolver a fucsina básica no álcool etílico e adicionar a água destilada, lentamente, com agitação. Adicionar 8ml de fenol ao corante, com uma pipeta com bulbo de borracha.

Nota: O corante *Fuchsin-Carbol* (Kinyoun *Acid Fast*) pode ser adquirido comercialmente (WWR Scientific Products, EUA).

2. Solução Álcool-Ácido (v/v)

Álcool etílico	90ml
Ácido sulfúrico	10ml

• Armazenar à temperatura ambiente. Estável por um ano.

3. Solução Aquosa de Verde de Malaquita a 3% (m/v)

Verde de malaquita	3g
Água destilada-deionizada	100ml

• Armazenar à temperatura ambiente. Estável por um ano.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.

2. Preparar o esfregaço com uma a duas gotas de fezes frescas ou preservadas. Deixar secar à temperatura de 60°C no aquecedor de lâminas (*slide warmer*). Não preparar esfregaços espessos. As amostras fecais formolizadas poderão ser concentradas pela centrifugação (500 x *g*/10min).

3. Fixar com álcool metílico por 30 segundos (deixar secar à temperatura ambiente).

4. Corar com o corante de Kinyoun por um minuto. Lavar rapidamente com água destilada e drenar.

5. Diferenciar com solução álcool-ácido por dois minutos. Lavar rapidamente com água destilada e drenar.

6. Corar o fundo da preparação com solução de verde de malaquita a 3% por dois minutos.

7. Lavar rapidamente com água destilada e drenar.

8. Deixar o esfregaço secar e montar com resina sintética (*Cytoseal* 60).

9. Examinar 200 a 300 campos do esfregaço com objetiva de imersão (100X).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Observação: Cubas de *Coplin* poderão ser usadas nas diferentes fases do procedimento de coloração.

Controle de Qualidade

Incluir ao método de coloração uma lâmina-controle com *C. parvum*, preparada com amostra fecal preservada pela solução salina de formaldeído a 10%. Os oocistos apresentam coloração do rosa ao vermelho sobre um fundo uniformemente corado em verde.

Características da Coloração

Os oocistos do *C. parvum* e da *I. belli* apresentam coloração do rosa ao vermelho, ao púrpura intenso. Alguns dos quatro esporozoítos podem ser vistos nos oocistos do *Cryptosporidium*. Os oocistos imaturos da *Isospora* aparecem corados, enquanto os oocistos maduros mostram os dois esporocistos corados, usualmente do rosa ao púrpura, com uma zona clara entre os esporocistos corados e a parede do oocisto. O fundo da preparação é corado em verde. Os organismos presentes freqüentemente apresentam, entre eles, uma intensidade de cor variável. Quando presentes, os oocistos de *Cyclospora cayetanensis* com tamanho de aproximadamente 10μm (variando de 8-9μm), assemelham-se aos do *C. parvum*, os oocistos não apresentam morfologia interna bem definida e a intensidade de cor tende a ser mais variável do que aquela vista no *Cryptosporidium* e na *Isospora*. Quando o paciente for portador de uma grande infecção com microsporídios (doente imunocomprometido) pequenos esporos (1 a 2μm) poderão ser vistos, mas não serão facilmente identificados como as bactérias e as pequenas células de leveduras[51] (Figs. 10.7 e 10.8).

Observações

1. Os organismos, como as bactérias álcool-ácido-resistentes e algumas *Nocardia* spp., coram-se de vermelho. Os esfregaços devem ser finos, pois esfregaços espessos não são convenientemente descorados. Após a etapa 3 é aconselhável aquecer os esfregaços fixados a 70°C por 10 minutos. Algumas amostras fecais, devido a sua consistência mucóide, requerem o tratamento com hidróxido de potássio (KOH) a 10%. As colorações (soluções de iodo) usadas no exame parasitológico das fezes não são indicadas para corar oocistos, como, também, a coloração da hematoxilina férrica e do tricrômico não são procedimentos seguros e recomendados.

2. A modificação da coloração de Kinyoun (a frio) não é indicada para corar amostras fecais preservadas pelo fixador álcool polivinílico (fixador APV). Entretanto, amostras fecais preservadas com o fixador acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF) apresentam ótimos resultados nos processos de coloração.

3. As técnicas de concentração de rotina (formalina-éter ou formalina-acetato de etila) podem ser usadas para isolar oocistos de *Isospora*.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

4. Adicionar 10 gotas de KOH a 10% ao sedimento fecal e agitar até a total homogeneização. Lavar com solução de formaldeído a 10% e centrifugar (500 x *g*/10min). Sem decantar o sobrenadante, retirar uma gota do sedimento e preparar um esfregaço fino. A possibilidade de encontrar oocistos aumenta pelo exame de amostras fecais múltiplas, em razão da intermitência da passagem desses organismos a partir do hospedeiro. Alguns autores recomendam, no mínimo, a colheita de três amostras em dias alternados.

5. Normalmente são usadas concentrações fracas de ácido sulfúrico (1% a 3%). Concentrações fortes do ácido removem demasiadamente o corante. As amostras fecais devem ser centrifugadas em tubos com tampa de rosca.

6. A coloração dos organismos ácido-resistentes pode ser acelerada pela adição de um detergente ou de um agente antiumidade. O tergitol n.º 7 (*Sigma Chemical Co.*) é indicado para esta modificação da coloração. Adicionar uma gota de tergitol n.º 7 para cada 30 a 40ml do corante de Kinyoun.

7. A coloração de fundo da preparação depende do corante usado: azul-de- metileno concede a cor azul aos organismos que não se coram pela fucsina-fenicada, enquanto que o verde de malaquita cora o fundo em verde e o ácido pícrico, em amarelo. A concentração do material fecal é essencial para a demonstração dos organismos[32].

8. Cubas de *Coplin* deverão ser usadas em todas as etapas do procedimento de coloração.

9. Alguns autores[30] substituem o verde de malaquita pelo azul-de-metileno (ver Anexo deste Capítulo).

Método Modificado de Ziehl-Neelsen (a Quente)

O método de Ziehl-Neelsen modificado requer o aquecimento da fucsina-fenicada usada na coloração. A *Cyclospora cayetanensis* tem sido descrita como ácido-resistente-variável, sendo recomendadas as modificações da coloração de Ziehl-Neelsen para demonstrar esse organismo[26,28,30].

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas) ou sedimento concentrado de fezes frescas ou fezes preservadas em solução salina de formaldeído a 10%. Outras amostras, como contéudo duodenal, biliar e pulmonar (escarro, lavado broncoalveolar e material de biópsia) favorecem com freqüência a coloração e o diagnóstico dos oocistos das espécies *C. parvum* e *I. belli*.

Reagentes

1. Álcool etílico (C_2H_6O)
2. Fenol, fundido a 44°C (C_6H_6O)
3. Fucsina básica (CI 42500) ($C_{19}H_{19}N_3O$)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

4. Ácido sulfúrico, concentrado (H_2SO_4)
5. Azul-de-metileno (CI 52015-Sigma) ($C_{16}H_{18}ClN_3S.3H_2O$)
6. Resina sintética (*Cytoseal* 60)

Preparação das Soluções

1. Solução de Fucsina-fenicada

a. Solução A

Fucsina básica	0,3g
Álcool etílico a 95% (v/v)	10ml

b. Solução B

Fenol (fundido a 44°C)	5g
Água destilada-deionizada q.s.p	100ml

c. Solução Corante

• Misturar as soluções A e B e armazenar à temperatura ambiente até o momento do uso. Estável por um ano.

2. Solução Aquosa de Ácido Sulfúrico a 5% (v/v)

• Armazenar à temperatura ambiente. Estável por um ano.

3. Solução Aquosa de Azul-de-metileno a 0,3% (m/v)

• Armazenar à temperatura ambiente. Estável por um ano.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
2. Preparar o esfregaço com fezes frescas ou preservadas.
3. Deixar secar à temperatura ambiente ou pelo aquecimento.
4. Corar com fucsina-fenicada, aquecendo a lâmina até a emissão de vapores por cinco minutos.
5. Escorrer o corante e lavar com água corrente.
6. Diferenciar com solução aquosa de ácido sulfúrico a 5% por 30 segundos.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

7. Lavar com água corrente. Drenar.

8. Corar o fundo com solução de azul-de-metileno a 0,3% por um minuto.

9. Lavar com água corrente e secar.

10. Montar com resina sintética (*Cytoseal* 60).

Observação: Cubas de *Coplin* poderão ser usadas nas diferentes fases do procedimento de coloração.

Características da Coloração

Com essas modificações do método de Ziehl-Neelsen os oocistos do *C. parvum* e da *I. belli* apresentam a coloração do rosa ao vermelho ao púrpura intenso; sendo visíveis alguns dos quatro esporozoítos nos oocistos do *Cryptosporidium*. Os oocistos imaturos da *Isospora* aparecem completamente corados, enquanto os oocistos maduros mostram os dois esporocistos corados, usualmente do rosa ao púrpura, com uma zona clara entre os esporocistos corados e a parede do oocisto. O fundo da preparação é corado em azul. Os organismos presentes freqüentemente apresentam, entre eles, uma variação na intensidade de cor. Quando presentes, os *Cyclospora cayetanensis*, com tamanho de aproximadamente 10μm, assemelham-se ao *C. parvum*, os oocistos não apresentam morfologia interna bem definida, e a intensidade de cor tende a ser mais variável do que àquela vista no *Cryptosporidium* e na *Isospora* (Figs. 10.7 e 10.8).

Observações

1. Não deixar o corante ferver e secar durante o processo de coloração. Aquecer a lâmina até a emissão de vapores. Após a etapa 2 é aconselhável aquecer os esfregaços fixados a 70°C por 10 minutos.

2. Poderão ser usadas diferentes concentrações de ácido sulfúrico (0,25% a 10%); entretanto, o tempo de diferenciação varia de acordo com a concentração usada. Habitualmente, são empregadas soluções de 1% a 5%. Ver observações referentes ao método modificado de Kinyoun.

Método Modificado da Safranina (a Quente)

O método modificado da safranina (a quente) é indicado para a coloração da *Cyclospora cayetanensis*, *C. parvum* e *I. belli*. Os oocistos da *Cyclospora* em amostras clínicas são rotineiramente demonstrados pelo método modificado de Kinyoun (a frio). Entretanto, os oocistos corados por esse método apresentam uma variabilidade de coloração desde organismos não corados aos totalmente corados, podendo conduzir a uma possível falsa identificação. O método modificado da safranina produz uma coloração uniforme dos oocistos. O corante deve ser aquecido até ferver, quando for usada placa de aquecimento (*slide warmer*) ou forno de microondas.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas) ou sedimento concentrado de fezes frescas ou fezes preservadas em solução salina de formaldeído a 10%.

Reagentes

1. Álcool metílico (CH_4O)
2. Ácido clorídrico (HCl)
3. Safranina O (CI 50240- Sigma) ($C_{20}H_{19}N_4Cl$)
4. Verde de malaquita (CI 42000) [$(C_{23}H_{25}N_2)_2.3C_2H_2O_4$]
5. Resina sintética (*Cytoseal* 60)

Preparação das Soluções

1. Solução Aquosa de Safranina a 1% (m/v)

• Armazenar à temperatura ambiente. Estável por um ano.

2. Solução Aquosa de Verde de Malaquita a 3% (m/v)

• Armazenar à temperatura ambiente. Estável por um ano.

3. Solução Ácido-Álcool (v/v)

Ácido clorídrico	3ml
Álcool metílico	97ml

• Armazenar à temperatura ambiente. Estável por um ano.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
2. Preparar o esfregaço com uma a duas gotas de fezes frescas ou preservadas. Deixar secar à temperatura de 60°C em aquecedor de lâmina (*slide warmer*). Não preparar esfregaços espessos.
3. Fixar com ácido-álcool por três a cinco minutos.
4. Lavar rapidamente com água destilada e drenar.
5. Corar com a safranina a 1% por um minuto. Aquecer o esfregaço em aquecedor de lâmina (*slide warmer*) até a emissão de vapores, não deixar secar o corante.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

6. Lavar rapidamente com água destilada e drenar.

7. Corar o fundo com solução de verde de malaquita a 3% por dois minutos.

8. Lavar com água destilada. Secar o esfregaço e montar com resina sintética (*Cytoseal* 60).

9. Examinar 200 a 300 campos do esfregaço com objetiva de imersão (100X).

Características de Coloração

Os oocistos aparecem arredondados corados em brilhante vermelho-alaranjado sobre um fundo uniforme corado em verde.

Observação: Cubas de *Coplin* poderão ser usadas nas diferentes fases do processo de coloração.

Controle de Qualidade (CQ)

Incluir ao método de coloração uma lâmina-controle com *C. parvum*, preparada com amostra fecal preservada pela solução salina de formaldeído a 10%. Os oocistos aparecem arredondados corados em brilhante vermelho-alaranjado sobre um fundo uniformemente corado em verde.

Método Modificado de Ziehl-Neelsen-Dimetilsulfóxido (DMSO)

O método modificado de Ziehl-Neelsen pela adição de dimetilsulfóxido (DMSO) foi descrito por Pahjola e cols.[50] para a coloração de esfregaços fecais frescos. Os oocistos apresentam uma coloração em relevo, facilmente distinguida do material do fundo da preparação.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas) ou sedimento de fezes frescas.

Reagentes

1. Fucsina básica (CI 42500) ($C_{19}H_{19}N_3O$)
2. Fenol fundido a 44°C (C_6H_6O)
3. Álcool etílico (C_2H_6O)
4. Glicerina ($C_3H_8O_3$)
5. Dimetilsulfóxido (DMSO) (C_2H_6SO)
6. Verde de malaquita (CI 42000) [$(C_{23}H_{25}N_2)_2.3C_2H_2O_4$]

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

7. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
8. Álcool metílico absoluto (CH_4O)

Preparação das Soluções

1. Corante Fenol-Fucsina-DMSO

Fucsina básica	4g
Álcool etílico a 95%	25ml
Fenol fundido (44°C)	12ml
Glicerina	25ml
DMSO	25ml
Água destilada-deionizada	75ml

• Dissolver 4g de fucsina básica em 25ml de álcool etílico a 95%. Adicionar lentamente com agitação 12ml de fenol fundido a 44°C ao corante (solução fucsina-álcool etílico). Acrescentar 25ml de glicerina, 25ml de DMSO e 75ml de água destilada-deionizada à solução fucsina-álcool etílico. Misturar. Deixar a solução em repouso por 30 minutos. Filtrar. Estocar em frasco de vidro âmbar com tampa esmerilhada à temperatura ambiente.

2. Solução Aquosa de Verde de Malaquita a 2% (m/v)

• Armazenar à temperatura ambiente. Estável por um ano.

3. Solução Diferenciadora e Corante (Fundo da Preparação)

Solução aquosa de verde de malaquita a 2%	22ml
Glicerina	50ml
Ácido acético glacial	30ml

• Misturar lentamente, sob agitação contínua, 22ml de solução aquosa de verde de malaquita a 2%, 50ml de glicerina e 30ml de ácido acético glacial. Estocar em frasco de vidro âmbar com tampa esmerilhada à temperatura ambiente.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
2. Preparar os esfregaços com fezes frescas. Deixar secar à temperatura ambiente.
3. Fixar os esfregaços durante cinco a 10 minutos com álcool metílico. Deixar secar à temperatura ambiente.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

4. Corar os esfregaços durante cinco minutos com a solução corante fenol-fucsina-DMSO.

5. Escorrer o corante. Lavar os esfregaços com água corrente até que o corante não seja mais removido. Usualmente são necessários 10 a 30 segundos.

6. Imergir os esfregaços por um minuto na solução diferenciadora ou até que apareça a cor verde no fundo da preparação.

7. Lavar os esfregaços com água corrente durante 10 segundos. Escorrer e deixar secar à temperatura ambiente na posição vertical.

8. Adicionar óleo de imersão diretamente sobre o esfregaço corado e examinar com objetivas de pequeno aumento e de grande aumento (100X). Ler no mínimo 100 campos. Os esfregaços não devem ser montados com resina sintética ou bálsamo do Canadá, como, também, a preparação não deve ser coberta com uma lamínula.

Observação: Cubas de *Coplin* poderão ser usadas nas diferentes fases do procedimento de coloração.

Características da Coloração

Os oocistos do *C. parvum* apresentam coloração do rosa ao vermelho. O fundo da preparação é corado em verde pálido. As leveduras aparecem uniformemente coradas em azul-esverdeado (Figs. 10.7 e 10.8).

Controle de Qualidade

Métodos de coloração derivados de Ziehl-Neelsen: Henriksen-Pohlenz; Kinyoun modificado (a frio); Ziehl-Neelsen modificado (a quente) e Ziehl-Neelsen modificado (DMSO).

1. Incluir ao método de coloração uma lâmina-controle com *C. parvum*, preparada com amostra fecal preservada pela solução salina de formaldeído a 10%. Quando os oocistos do *Cryptosporidium* apresentarem uma boa coloração, os organismos *I. belli* (20-30μm x 10-19μm) e *Cyclospora cayetanensis* (8-10μm) também tomarão o corante.

2. Os oocistos do *C. parvum* apresentam coloração do rosa ao vermelho, ao púrpura intenso, com diâmetro de aproximadamente 4 a 6μm, com quatro esporozoítos internos. O fundo da preparação é corado em azul.

3. Conferir a aderência (macroscopicamente) dos espécimes à lâmina.

4. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. Colocar as objetivas e as oculares originais no microscópio durante a Calibração. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

5. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados. Quando necessário seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[31,50,51].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Método de Heine

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas) ou fezes preservadas em solução salina de formaldeído a 10%.

Reagentes

1. Fucsina básica (CI 42500) ($C_{19}H_{19}N_3O$)
2. Fenol, fundido a 44°C (C_6H_6O)
3. Corante de Kinyoun

Fucsina básica	4g
Fenol, fundido a 44°C	8ml
Álcool etílico a 95% (v/v)	20ml
Água destilada-deionizada q.s.p.	100ml

• Dissolver a fucsina básica no álcool etílico e adicionar a água destilada, lentamente, com agitação. Adicionar 8ml de fenol ao corante, com uma pipeta com bulbo de borracha.

Nota: O corante *Fuchsin-Carbol* (Kinyoun *Acid Fast*) pode ser adquirido comercialmente (*WWR Scientific Products, EUA*).

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
2. Misturar em lâmina de microscopia um volume igual de fezes frescas ou formolizadas e do corante de Kinyoun.
3. Preparar esfregaço fino e deixar secar à temperatura ambiente.
4. Adicionar óleo de imersão diretamente sobre o esfregaço corado e cobrir com lamínula.
5. Observar através do microscópio de contraste de fase ou de fundo claro.

Características da Coloração

Para evitar a retração dos oocistos é necessário observar a preparação dentro de 10 minutos que se seguem à secagem do esfregaço. Esse método coloca em evidência somente os oocistos, os quais, pela microscopia de fundo claro, são observados sem coloração, mas muito refringentes, sobre o fundo rosa. De preferência, a observação deverá ser realizada pela microscopia de contraste de fase. Os oocistos aparecem brilhantes sobre o fundo cinza da preparação. Os outros elementos não parasitas são corados de vermelho[24,34] (Fig. 10.6).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

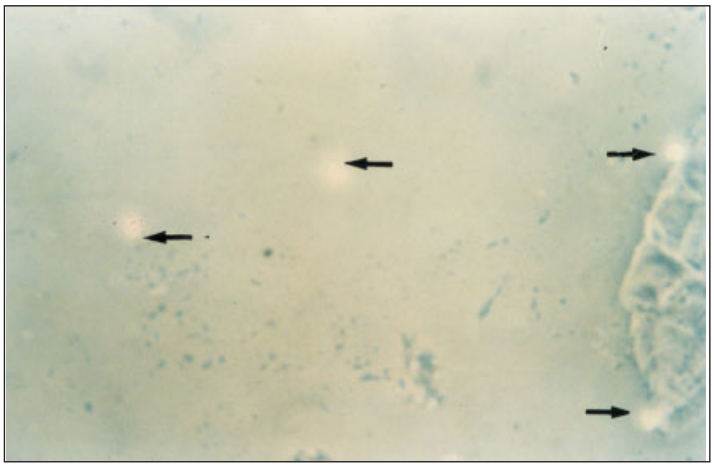


Fig. 10.6 — *As setas indicam oocistos de* Cryptosporidium parvum *corados pelo método de Heine. (Cortesia do Dr. Denis Lemeteil, Faculté Mixte de Medicine et de Pharmacie de Rouen, Rouen, França.)*

Observações

1. Usando as variações derivadas de Ziehl-Neelsen, a coloração dos organismos, do rosa ao vermelho, depende da penetração do corante (o calor aumenta a penetração), da espessura do esfregaço e da idade da amostra.

2. Os organismos podem perder ou não a capacidade de absorver o corante depois de longo tempo fixados em solução salina de formaldeído a 10%.

3. Uma coloração de fundo uniforme, azul, verde etc., depende dos corantes usados. A pesquisa dos oocistos se torna difícil em pacientes que não apresentam a típica diarréia aquosa.

Coloração Negativa pela Fucsina-Fenicada

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas) ou sedimento concentrado de fezes frescas ou fezes preservadas em solução salina de formaldeído a 10%.

Reagentes

1. Fucsina básica (CI 42500) ($C_{19}H_{19}N_3O$)
2. Fenol, fundido a 44°C (C_6H_6O)
3. Corante de Kinyoun

Fucsina básica	4g
Fenol, fundido a 44°C	8ml
Álcool etílico a 95% (v/v)	20ml
Água destilada-deionizada q.s.p.	100ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

• Dissolver a fucsina básica no álcool etílico e adicionar a água destilada, lentamente com agitação. Adicionar 8ml de fenol ao corante com uma pipeta com bulbo de borracha.

Nota: O corante *Fuchsin-Carbol* (Kinyoun *Acid Fast*) pode ser adquirido comercialmente (*WWR Scientific Products, EUA*).

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
2. Misturar em lâmina de microscopia um volume igual (3 a 10µl) de fezes frescas ou formolizadas e o corante de Kinyoun.
3. Preparar esfregaço fino e deixar secar à temperatura ambiente.
4. Adicionar óleo de imersão diretamente sobre o esfregaço corado e cobrir com lamínula.
5. Observar através do microscópio de fundo claro (430X).

Características da Coloração

Todos os elementos coram-se em negro, com exceção dos oocistos, os quais apresentam-se brilhantes e refringentes[30].

Método Rápido da Safranina

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas) ou sedimento concentrado de fezes frescas, ou fezes preservadas em solução salina de formaldeído a 10%.

Reagentes

1. Ácido clorídrico (HCl)
2. Álcool metílico (CH_4O)
3. Safranina O (CI 50240-Sigma) ($C_{20}H_{19}N_4Cl$)
4. Cristal violeta (*Bacto Crystal violet*) (CI 42555) ($C_{25}H_{30}ClN_3$)
5. Azul-de-metileno (CI 52015-Sigma) ($C_{16}H_{18}ClN_3S.3H_2O$)

Preparação das Soluções

1. Solução Alcoólica de Ácido Clorídrico (v/v)

Ácido clorídrico	3ml
Álcool metílico	100ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Solução Aquosa de Safranina a 1% (m/v)

• Armazenar à temperatura ambiente. Estável por um ano.

3. Solução Aquosa de Azul-de-metileno a 1% (m/v)

• Armazenar à temperatura ambiente. Estável por um ano.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
2. Preparar um esfregaço fino com fezes frescas ou formolizadas.
3. Deixar secar à temperatura ambiente.
4. Fixar pelo calor, passando rapidamente a lâmina no bico de *Bunsen*.
5. Fixar com solução alcoólica de ácido clorídrico a 3% por cinco minutos e deixar secar à temperatura ambiente.
6. Lavar com água corrente e drenar.
7. Corar com a solução aquosa de safranina a 1% por um minuto e aquecer até o aparecimento de vapores.
8. Lavar com água corrente e drenar.
9. Corar o fundo da preparação com solução aquosa de azul-de-metileno a 1%.
10. Adicionar óleo de imersão diretamente sobre o esfregaço corado e cobrir com lamínula.

Características da Coloração

Os oocistos apresentam-se corados em brilhante vermelho-alaranjado e as leveduras mostram a mesma coloração do fundo da preparação[9].

Observações

A solução aquosa de azul-de-metileno a 1% poderá ser substituída, com bons resultados, pela solução aquosa de cristal violeta; entretanto, a solução aquosa de verde de malaquita a 5% mostrou-se insatisfatória.

Método Modificado da Safranina (Forno de Microondas)

Coloração de Oocistos de *Cyclospora cayetanensis*

O método de coloração da safranina modificada cora os oocistos da *Cyclospora cayetanensis* uniformemente em um brilhante vermelho-alaranjado sobre um fundo azul (azul-de-metileno) ou verde (verde de malaquita), des-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

de que os esfregaços fecais sejam aquecidos no forno de microondas antes da coloração. Esse procedimento de coloração é rápido, seguro e de fácil realização[60].

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas) ou sedimento concentrado de fezes frescas ou fezes preservadas em solução salina de formaldeído a 10%.

Reagentes

1. Safranina O (CI 50240-Sigma) ($C_{20}H_{19}N_4Cl$)
2. Azul-de-metileno (CI 52015-Sigma) ($C_{16}H_{18}ClN_3S.3H_2O$)
3. Verde de malaquita (CI 42000) [$(C_{23}H_{25}N_2)_2.3C_2\ H_2O_4$]
4. Citrato de sódio, cristais ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$)
5. Resina sintética (*Cytoseal* 60)

Soluções

1. Solução Aquosa de Safranina a 1% (m/v) (pH 6,5)

• Armazenar à temperatura ambiente. Estável por um ano.

2. Solução Aquosa de Azul-de-metileno a 1% (m/v) ou Solução Aquosa de Verde de Malaquita a 1% (m/v)

• Armazenar à temperatura ambiente. Estável por um ano.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.

2. Preparar o esfregaço, colocando em lâminas de microscopia uma gota (50µl) de suspensão de fezes frescas ou formolizadas. Deixar secar à temperatura ambiente.

3. Mergulhar as lâminas na solução aquosa de safranina a 1% e aquecer no forno de microondas, com potência total (650W) por 30 segundos (cubas de *Coplin* deverão ser usadas nessa fase do procedimento de coloração).

4. Lavar com água corrente por 30 segundos.

5. Corar o fundo da preparação mergulhando as lâminas na solução aquosa de azul-de-metileno a 1% ou na solução aquosa de verde de malaquita a 1% por um minuto (cubas de *Coplin* deverão ser usadas nessa fase do procedimento de coloração).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

6. Lavar com água corrente por 30 segundos e secar.
7. Montagem com resina sintética (*Cytoseal* 60).

Características da Coloração

Os oocistos aparecem arredondados com 8 a 10μm, uniformemente corados em um brilhante vermelho-alaranjado sobre um fundo azul (azul-de-metileno) (Fig. 10.6B) ou verde (verde de malaquita) (Fig. 10.6C).

Observações

1. O procedimento original de Baxby, Blundell e Hart[8] não cora com regularidade os oocistos de *Cyclospora*.

2. O aquecimento na chama do bico de *Bunsen* com freqüência não é uniforme devido à evaporação e o corante que cobre o esfregaço seca, deixando ocultos resíduos de cristais, os quais interferem na coloração do oocisto. O aquecimento dos esfregaços em banho de água a 60°C também não mostrou bons resultados.

3. Quando o esfregaço é aquecido no forno de microondas, depois de ter sido coberto pela solução aquosa de safranina (em água destilada acidificada em pH 2,5 ou pH 6,5 ou em tampão de citrato), é observada uma coloração uniforme nos oocistos.

4. O exato modo de ação do aquecimento no forno de microondas não é conhecido. Entretanto, alguns autores supõem que as ligações cruzadas das proteínas (*cross-linking of proteins*) poderiam ser alteradas pelo aquecimento no forno de microondas, ou existiria a possibilidade de o calor modificar a configuração da superfície dos oocistos, tornando a membrana permeável, favorecendo a penetração uniforme do corante safranina.

5. Visvesvara e cols.[60] obtiveram excelentes resultados na identificação da *Cyclospora*, preservando a amostra fecal em formaldeído a 10%, corando os esfregaços pela safranina a 1% (pH 6,5) e o fundo da preparação com verde de malaquita a 1% (safranina-verde de malaquita). Esfregaços individuais mergulhados na solução de safranina são aquecidos por 30 segundos no forno de microondas, enquanto os grupos de cinco a 10 esfregaços mergulhados na solução corante na cuba de *Coplin* são aquecidos por um minuto.

6. As amostras fecais armazenadas na solução de bicromato de potássio a 2,5% não mostram resultados de coloração uniforme. Entretanto, quando o preservador é removido pela lavagem com solução salina tamponada e após as amostras serem fixadas em solução de formaldeído a 10%, os oocistos corados pela safranina apresentam uma coloração uniforme.

7. Para a obtenção de ótimos resultados na coloração, a solução corante de safranina deve ser trocada após 10 ciclos de coloração. Quando os oocistos são corados pelo método de Giemsa, os organismos aparecem arredondados, de coloração azul tênue.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

8. Certos organismos não ficam corados e são dificilmente identificados. As leveduras e outros artefatos das fezes, com o mesmo tamanho, coram-se em azul. Os organismos não são corados pelos métodos do tricrômico, do *chromotrope* e do Gram-*Chromotrope*. A congelação das amostras fecais a -20°C não altera as propriedades de coloração dos oocistos, os quais são corados em brilhante vermelho-alaranjado, como os organismos que não foram congelados[60].

Coloração de Oocistos de *Cryptosporidium parvum*

A coloração da safranina modificada por Visvesvara e cols.[60] é também indicada para a coloração de oocistos de *C. parvum*.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas) ou sedimento concentrado de fezes frescas ou fezes preservadas em solução de formaldeído a 10%.

Reagentes

1. Ácido clorídrico (HCl)
2. Álcool metílico (CH_4O)
3. Safranina O (CI 50240-Sigma) ($C_{20}H_{19}N_4Cl$)
4. Azul-de-metileno (CI 52015-Sigma) ($C_{16}H_{18}ClN_3S.3H_2O$)
5. Verde de malaquita (CI 42000) [$(C_{23}H_{25}N_2)_2.3C_2H_2O_4$]
6. Citrato de sódio, cristais ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$)
7. Resina sintética (*Cytoseal* 60)

Soluções

1. Solução Aquosa Ácida de Safranina a 1% (m/v) (pH 6,5)

• Armazenar à temperatura ambiente. Estável por um ano.

2. Solução Aquosa de Azul-de-metileno a 1% (m/v) ou Solução Aquosa de Verde de Malaquita a 1% (m/v)

• Armazenar à temperatura ambiente. Estável por um ano.

3. Solução Alcoólica de Ácido Clorídrico (v/v)

Ácido clorídrico	3ml
Álcool metílico	100ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Coloração da Amostra

1. Preparar o esfregaço colocando em lâminas de microscopia uma gota (50µl) de suspensão de fezes frescas ou formolizadas.

2. Secar o esfregaço à temperatura de ~60°C (aquecedor de lâmina). Antes de corar, deixar o esfregaço esfriar à temperatura ambiente.

3. Imergir na solução ácido-álcool a 3% por cinco minutos (cubas de *Coplin* deverão ser usadas nessa fase do procedimento de coloração).

4. Lavar com água corrente.

5. Imergir as lâminas na solução aquosa de safranina a 1% e aquecer no forno de microondas, com potência total (650W) por um minuto (cubas de *Coplin* deverão ser usadas nessa fase do procedimento de coloração).

6. Lavar com água corrente.

7. Corar o fundo da preparação mergulhando as lâminas na solução aquosa de azul-de-metileno a 1% ou na solução aquosa de verde de malaquita por um minuto (cubas de *Coplin* deverão ser usadas nessa fase do procedimento de coloração).

8. Lavar com água corrente e secar.

9. Fazer a montagem com resina sintética (*Cytoseal* 60).

Coloração pela Hematoxilina Férrica Modificada

Esse método de coloração foi desenvolvido para amostras fecais preservadas com o fixador acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF). O método de coloração pela hematoxilina férrica modificada pela incorporação do corante de Kinyoun (solução de fucsina-fenicada) é uma tentativa de apresentar um procedimento simultâneo de coloração para trofozoítos, cistos e oocistos. A combinação do corante hematoxilina férrica, com o material preservado pela solução fixadora SAF e com o corante de Ziehl-Neelsen modificado, resultou em um método com muito bom rendimento, indicado para o diagnóstico das espécies *C. parvum*, *Cyclospora cayetanensis* e *I. belli*[46].

Amostra

Material fecal preservado em acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF). Os espécimes frescos poderão ser corados após a fixação (30 minutos) em SAF.

Reagentes

1. Claras de ovos de galinha
2. Glicerina ($C_3H_8O_3$)
3. Salicilato de sódio ($C_7H_5O_3Na$) ou timol ($C_{10}H_{14}O$) ou tintura de mertiolato (1:10.000) ou formaldeído 37-40% (HCOH) (1:100)
4. Acetato de sódio triidratado ($C_2H_3O_2Na.3H_2O$)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

5. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
6. Formaldeído 37-40% (HCHO)
7. Álcool etílico absoluto (C_2H_6O)
8. Álcool etílico a 70%, 95% (v/v)
9. Ácido clorídrico concentrado (HCl)
10. Corante de Kinyoun (solução de fucsina-fenicada)
11. Hematoxilina, forma cristalina (CI 75290) ($C_{16}H_{14}O_6$)
12. Ácido pícrico (CI 10305) [$C_6H_2(OH)(NO_2)_3$]
13. Sulfato ferroso amoniacal [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$]
14. Sulfato férrico amoniacal [$FeNH_4(SO_4)_2.12H_2O$]
15. Xilol (Xileno) (C_8H_{10}) ou Toluol (Tolueno) (C_7H_8)

Preparação das Soluções

1. Corante de Kinyoun (solução de Fucsina-fenicada)

Fucsina básica	4g
Fenol, fundido a 44°C	8ml
Álcool etílico a 95% (v/v)	20ml
Água destilada-deionizada q.s.p.	100ml

• Dissolver a fucsina básica no álcool etílico e adicionar a água destilada lentamente com agitação. Adicionar 8ml de fenol ao corante, com uma pipeta com bulbo de borracha.

Nota: O corante *Fuchsin-Carbol* (*Kinyoun Acid Fast*) pode ser adquirido comercialmente (*WWR Scientific Products*, *EUA*).

2. Solução Corante de Hematoxilina Férrica de Spencer e Monroe[14,55]

Solução I

Hematoxilina, forma cristalina	10g
Álcool etílico absoluto	1.000ml

• Dissolver a hematoxilina no álcool etílico absoluto. Estocar em frasco de vidro de cor âmbar. Deixar "amadurecer" durante seis meses, ou durante uma semana exposto ao sol.

Solução II

Sulfato ferroso amoniacal	10g
Sulfato férrico amoniacal	10g

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Ácido clorídrico concentrado	10ml
Água destilada-deionizada	1.000ml

Solução de Trabalho

• Misturar partes iguais das soluções I e II. Esta solução deve ser preparada todas as semanas.

3. Solução Aquosa Saturada de Ácido Pícrico (m/v)

Ácido pícrico	2g
Água destilada-deionizada	100ml

• Adicionar o ácido pícrico à água. Agitar vigorosamente e deixar em repouso durante vários dias. Depois de quatro a cinco dias, alguns cristais do ácido pícrico podem permanecer não dissolvidos. Usar o líquido sobrenadante límpido ou filtrar a solução. Essa solução diferenciadora tem conservação indefinida e não apresenta problemas de estocagem.

4. Solução de Ácido-Álcool (v/v)

Ácido clorídrico (HCl) concentrado	30ml
Álcool etílico absoluto q.s.p.	1.000ml

5. Solução de Álcool Etílico-Amônia (v/v)

Álcool etílico a 70%	50ml
Amônia	0,5-1ml

6. Solução Fixadora Acetato de Sódio-Ácido Acético-Formaldeído (SAF)

Acetato de sódio	1,5g
Ácido acético glacial	2ml
Formaldeído 37-40%	4ml
Água destilada-deionizada	92,5ml

• Misturar em um *beaker* os componentes. Estocar o fixador em frasco de plástico ou em frasco de vidro com tampa esmerilhada.

7. Albumina Fixadora de Mayer

1. Colocar as claras de vários ovos frescos em um prato fundo.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Bater as claras com um garfo ou com um batedor de ovos, até que elas estejam brancas e viscosas.

3. Deixar em repouso por uma hora e, em seguida, retirar a espuma da superfície e transferir o líquido remanescente para uma proveta.

4. Adicionar ao líquido igual volume de glicerina (v/v) e 1g de salicilato de sódio ou timol, ou 0,5ml de tintura de mertiolato ou formaldeído 37-40%, para prevenir a proliferação de fungos, a cada 100ml da mistura.

5. Agitar vigorosamente a mistura e filtrar através de papel-filtro. A filtração é lenta, sendo necessário usar pequenas quantidades da mistura, com trocas diárias do filtro.

6. Estocar em frasco com tampa esmerilhada à temperatura de 4°C com data de expiração de três meses.

Coloração da Amostra

Preparação dos esfregaços

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.

2. Em uma lâmina, colocar uma gota da amostra fecal concentrada, preservada com SAF e uma gota de albumina fixadora de Mayer.

3. Misturar as gotas e preparar um esfregaço estirado.

4. Deixar secar à temperatura ambiente (o esfregaço aparece opaco quando seco).

Coloração

1. Álcool etílico a 70%, cinco minutos.

2. Lavar com água destilada-deionizada em cuba de *Coplin*, dois minutos (não usar água corrente).

3. Corante de Kinyoun, cinco minutos.

4. Lavar com água corrente, um minuto.

5. Solução ácido-álcool, quatro minutos

Esta etapa pode ser realizada como segue:

- Solução de ácido-álcool, dois minutos.
- Lavar com água corrente, um minuto.
- Solução de ácido-álcool, dois minutos.
- Lavar com água corrente, um minuto.
- Continuar a seqüência da coloração na etapa 7.

6. Lavar com água corrente, um minuto.

7. Solução corante de trabalho de hematoxilina férrica, oito minutos.

8. Lavar com água destilada-deionizada, um minuto.

9. Solução de trabalho de ácido pícrico, três a quatro minutos.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

10. Lavar com água corrente, 10 minutos.
11. Álcool etílico a 70%-amônia, três minutos.
12. Álcool etílico a 95%, cinco minutos.
13. Álcool etílico absoluto, cinco minutos.
14. Xilol ou tolueno (1), cinco minutos.
15. Xilol ou tolueno (2), cinco minutos.

Observação: Cubas de *Coplin* poderão ser usadas nas diferentes fases do processo de coloração.

Características da Coloração

Os trofozoítos e cistos de protozoários coram-se de azul-cinzento ao preto, como também o material de fundo. As estruturas nucleares, os corpos de inclusão e o citoplasma adjacente apresentam-se em preto. Os oocistos de *C. parvum* e *I. belli* apresentam coloração do rosa ao vermelho ao púrpura intenso[46].

Observações

1. Os métodos de coloração modificados, a frio (Henriksen-Pohlenz e Kinyoun[35] e a quente (Ziehl-Neelsen)[27,30] são excelentes procedimentos de coloração para oocistos de coccídios (*C. parvum* e *I. belli*).

2. Alguns autores afirmam que a penetração do corante no método a quente é uniforme e apresenta melhores resultados, mas poderá haver uma retração do oocisto. Entretanto, se houver diferenças, entre as duas condutas, a quente e a frio, essas, provavelmente, são mínimas.

3. O *Cyclospora cayetanensis* é duas vezes maior que o *C. parvum* e facilmente visível, apesar de ser ácido-resistente-variável. Os esporos dos microsporídios são também ácido-resistentes e o seu tamanho (1 a 2μm) torna a identificação muito difícil sem o uso de corantes especiais ou de anticorpos monoclonais. A microscopia eletrônica tem sido usada extensivamente para confirmar a infecção e classificar os organismos nos tecidos.

4. Os parasitologistas deverão estar atentos com a *Cyclospora cayetanensis*, quando são usadas as variações da coloração de Ziehl-Neelsen para a detecção e identificação do *C. parvum*.

5. Em razão do risco de contaminação do operador, é necessário tomar precauções durante a manipulação (usar luvas, descontaminar o material e incinerar os resíduos). Quando as fezes forem provenientes de pacientes com SIDA/AIDS os laboratórios devem tomar os mesmos cuidados usados para a hepatite.

Observação: Cubas de *Coplin* poderão ser usadas nas diferentes fases do processo de coloração.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Controle de Qualidade (CQ)

1. Incluir ao procedimento de coloração uma lâmina controle com *C. parvum*, preparada com amostra fecal preservada em solução salina de formaldeído a 10%.

2. Quando os oocistos do *Cryptosporidium* apresentarem uma boa coloração (rosa-vermelho ao púrpura com o fundo da preparação em azul uniforme), os organismos *I. belli* e *Cyclospora cayetanensis* também tomarão o corante.

3. Conferir a aderência macroscópica dos espécimes à lâmina.

4. A coloração do rosa ao vermelho depende da penetração do corante, da espessura do esfregaço e da idade do espécime.

5. A solução salina de formaldeído a 10% apresenta a vantagem de fixar os oocistos e destruir o seu poder patogênico e inativar outros agentes infecciosos. Entretanto, são contraditórias as afirmações de que os organismos perderiam a capacidade de tomar o corante (fucsina-fenicada) depois de um longo período de armazenamento em solução de formaldeído a 10%.

6. Testar diariamente a solução de trabalho da hematoxilina-férrica, pela adição de uma gota do corante à água corrente. Se não houver desenvolvimento de cor azul, preparar uma nova solução de trabalho.

7. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. Colocar as objetivas e as oculares originais no microscópio durante a calibração. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

8. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados. Quando necessário seguir o plano de ação para resultados "fora de controle"[14,31].

REVISÃO: MODIFICAÇÕES DAS COLORAÇÕES DE ZIEHL-NEELSEN

Princípio: Produzir contraste de coloração entre os artefatos do fundo da preparação e os parasitos presentes; permitir o exame e o reconhecimento das características ácido-resistentes dos organismos através de objetiva de grande aumento (objetiva de 40X, totalizando um aumento de 400X). Indicadas para isolar e identificar oocistos de coccídios intestinais. A morfologia interna (esporozoítos) dos oocistos do *Cryptosporidium* é observada através do exame com óleo de imersão (1.000X de aumento).

Amostra: Amostras fecais frescas ou preservadas pelo formaldeído, ou SAF.

Reagentes: Coloração de Kinyoun modificada (a frio), Ziehl-Neelsen modificada (a quente) e soluções associadas; soluções desidratantes (álcoois e xilol); resinas sintéticas ou bálsamo do Canadá. Os agentes de descoloração são menos intensos do que o ácido-álcool usado na rotina de coloração dos organismos ácido-resistentes (esse fato torna o procedimento um método modificado).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Exame: Examinar no mínimo 300 campos com objetiva de imersão; um número adicional de campos poderá ser requerido se um organismo suspeito não foi claramente identificado como ácido-resistente.

Resultados: Identificação de oocistos de *Cryptosporidium parvum* (4-5µm) e de *Isospora belli* (20-30 x 10-19µm); os oocistos da *Cyclospora cayetanensis* (8-10µm) também são visíveis; entretanto, são mais ácido-resistentes, com intensidade de cor variável. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

Observações e Limitações: As colorações de Kinyoun modificada (a frio) e de Ziehl-Neelsen modificada (a quente) são excelentes métodos para a coloração de oocistos de coccídios. Alguns parasitologistas afirmam que o método a quente resulta em melhor penetração do corante, mas as diferenças são provavelmente mínimas. As limitações do procedimento estão relacionadas com as amostras (correto tempo e velocidade de centrifugação; filtração através de gaze levemente umedecida em água corrente, dobrada duas vezes. Existem controvérsias relacionadas com a habilidade dos organismos em receberem o corante fucsina-fenicada depois de um longo período estocados e preservados em formalina a 10%. Os organismos são dificilmente identificados em pacientes que não apresentam a típica diarréia coleriforme (as fezes, quanto mais formadas, maior quantidade de artefatos apresentam).

ANEXO

Método Modificado de Kinyoun (a frio)

Esta técnica é indicada para a identificação de coccídios, especialmente *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* e *I. belli*. Nessa variação do método modificado de Kinyoun (a frio) é usada a solução alcoólica de azul-de-metileno a 0,3% para a coloração do fundo da preparação, enquanto no método descrito na página 248 é usada a solução aquosa de verde de malaquita a 3%[30].

Tabela 10.2.
Comparação entre *Cyclospora, Cryptosporidium* e *Isospora*

	Cyclospora	*Cryptosporidium*	*Isospora*
Número de esporocistos em cada oocisto	2	0	2
Número de esporozoítos em cada esporocisto	2	4 esporozoítos livres	4
Estágio nas fezes	Oocisto	Oocisto	Oocisto
Tamanho do oocisto (µm)	8-10	4-5	9-16x7,5-12
Coloração específica para amostras fecais	Safranina a quente	Ziehl-Neelsen mod./Safranina a quente	Ziehl-Neelsen mod./Safranina a quente
Autofluorescência	Presente	Ausente	Presente

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Tabela 10.3
Procedimentos de Coloração para *Cryptosporidium parvum

Métodos de Coloração	*Aparência dos Oocistos*	*Aparência das Leveduras*	*Referências*
Coloração direta			
Giemsa	Rosa	Azul	24
Gram	Vermelho	Púrpura	3
Corante de Kohn	Verde-escuro	Cinza	5
Azul-de-metileno	Azul-claro	Azul-escuro	21
Anilina-carbometil-violeta	Azul	Não se cora	40
Safranina + coloração de fundo	Alaranjado	MCFP*	8
Colorações derivadas de Ziehl-Neelsen			
Kinyoun	Rosa-vermelho	MCFP	38
Henriksen-Pohlenz	Vermelho	MCFP	35
Ziehl-Neelsen	Rosa-vermelho	MCFP	27
DMSO-fucsina fenicada	Vermelho	Não se cora	50
Hematoxilina férrica	Rosa-vermelho	Azul-cinzento	6
Colorações pelos fluorocromos			
Auramina-rodamina	Alaranjado	Não se cora	38
Auramina-fucsina fenicada	Alaranjado	Não se cora	16
Alaranjado de acridina	Verde-alaranjado	Alaranjado	38
Diaminofenilidona	Azul	Não se cora	37
Mepacrine	Alaranjado	Não se cora	59
Iodeto de propídio	Vermelho	Não se cora	37
Colorações negativas			
Fucsina-fenicada	Não se cora	Azul	34
Iodo	Não se cora	Marrom	38
Light green	Não se cora	Verde	17
Merbromine	Não se cora	Alaranjado	17
Prata-Metenamina	Não se cora	Preta	3
Nigrosina	Não se cora	Não se cora	46
Ácido Periódico de Schiff	Não se cora	Vermelho	27
Ácido fosfotúngstico	Marrom-claro	Preta	9
Acetato de Uranil	Marrom-claro	Preta	9

*Adaptado de O'Donoghue[42]. MCFP = Mesma coloração de fundo da preparação.

Reagentes

1. Álcool metílico (CH_4O)
2. Álcool etílico (C_2H_6O)
3. Fenol, fundido a 44°C (C_6H_6O)
4. Fucsima básica (CI 42500) ($C_{19}H_{19}N_3O$)
5. Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)
6. Azul-de-metileno (CI 52015-Sigma) ($C_{16}H_{18}ClN_3S.3H_2O$)
7. Hidróxido de Potássio (KOH)
8. Resina sintética (*Cytoseal* 60)

Preparação das Soluções

1. Corante de Kinyoun (Solução de Fucsina-fenicada)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

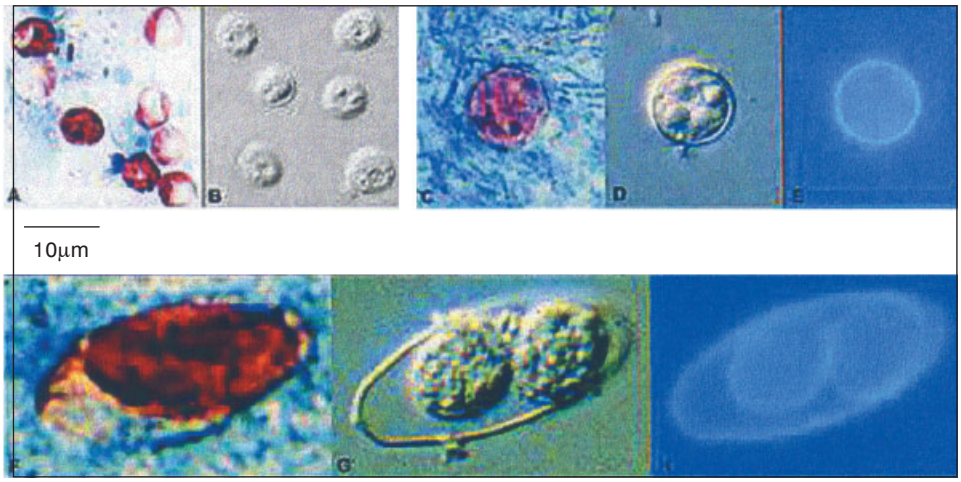


Fig. 10.7 — *Oocistos de coccídios humanos* Cryptosporidium parvum*,* Cyclospora cayetanensis *e* Isospora belli *diagnosticados por diferentes procedimentos: esfregaços corados pelos derivados de Ziehl-Neelsen (10.1A, 10.1C, 10.F), microscopia de contraste diferencial de interferência (DIC ou Nomarsky) (10.1B, 10.1D, 10.1G); epifluorescência (10.1E, 10.1H). Os oocistos de* Cryptosporidium parvum *não autofluorescem. (Cortesia da DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

a. Solução A

Fucsina básica	4g
Álcool etílico a 95% (v/v)	20ml

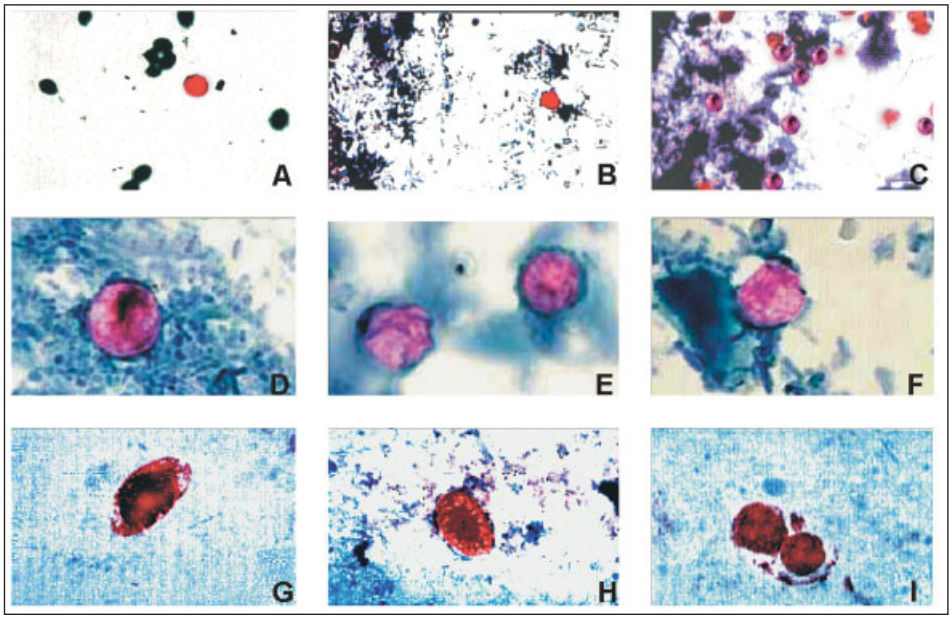


Fig. 10.8 — *Oocistos de coccídios humanos em esfregaços fecais corados pelo método de Ziehl-Neelsen modificado. (a, b, c) oocistos de* Cryptosporidium parvum *(cortesia de Denis Lemeteil, PhD, Faculté Mixte de Medicine et de Pharmacie de Rouen, Rouen, França); (d, e, f) oocistos de* Cyclospora cayetanensis *(cortesia de DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis); (g, h, i) oocistos de* Isopora belli *(cortesia da Profa. Lenilza Mattos de Lima, Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC).*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

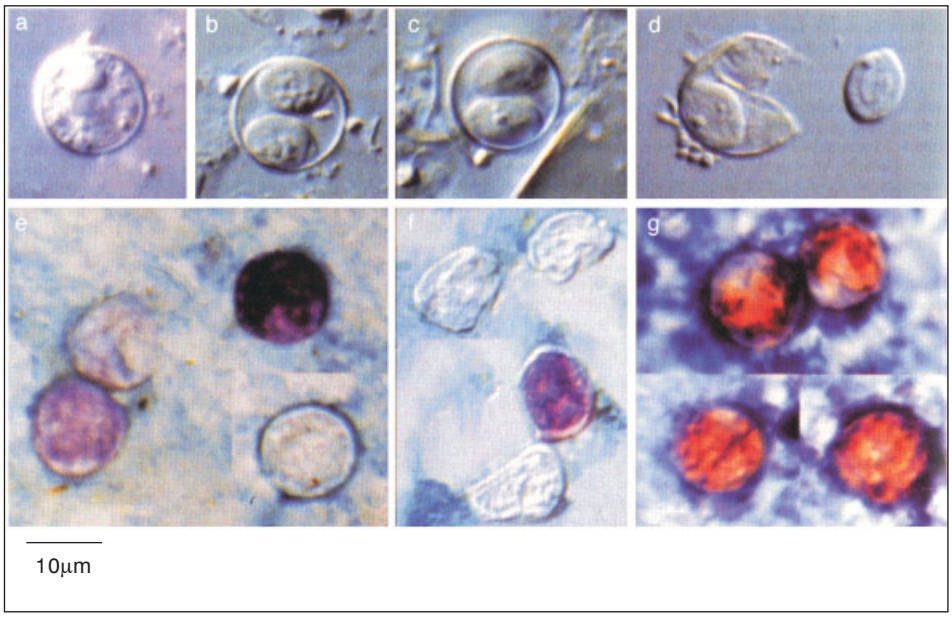


Fig. 10.9 — *Oocistos de* Cyclospora *em esfregaços a fresco e em preparações coradas. (a) oocistos em fezes frescas (microscopia de contraste diferencial de interferência; microscopia DIC); (b) oocisto esporulado depois de cinco dias de incubação, mostrando dois esporocistos (microscopia DIC); (c) oocisto esporulado maduro depois de 10 dias de incubação, mostrando dois esporocistos (microscopia DIC); (d) ruptura do oocisto, com um esporocisto no interior e outro em liberdade (microscopia DIC); (e) quatro oocistos em fezes frescas preservadas pela solução de formaldeído a 10% e coradas pela coloração de Ziehl-Neelsen modificada, mostrando a desigual (típica) coloração da* Cyclospora*; (f) quatro oocistos em fezes frescas preservadas pela solução de formaldeído a 10% e coradas pela coloração de Ziehl-Neelsen modificada, mostrando a variabilidade de coloração e o aumento da visualização dos oocistos não corados pela microscopia DIC; (g) quatro oocistos em fezes frescas preservadas pela solução de formaldeído a 10% e coradas pela coloração da safranina, mostrando a uniformidade de coloração dos oocistos por esse método. Escala (barra): 10μm. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

b. Solução B

Fenol, fundido a 44°C	8g
Água destilada-deionizada q.s.p.	100ml

c. Solução Corante

Solução A	20ml
Solução B	100ml

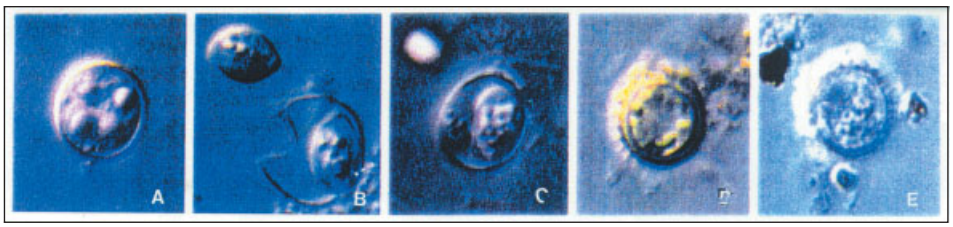


Fig. 10.10 — Cyclospora *spp. "versus" artefatos. (A, B)* Cyclospora *spp. (fezes humanas); (C) fezes concentradas de roedores; (D, E) sedimento concentrado de água de rio. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

• Misturar as soluções e armazenar à temperatura ambiente até o momento do uso. Estável por um ano

ou

Fucsina básica	4g
Fenol, fundido a 44°C	8ml
Álcool etílico a 95% (v/v)	20ml
Água destilada-deionizada q.s.p.	100ml

• Dissolver a fucsina básica no álcool etílico e adicionar a água destilada, lentamente com agitação. Adicionar 8ml de fenol ao corante, com uma pipeta com bulbo de borracha.

2. Solução de Álcool Etílico a 50% (v/v)

Armazenar à temperatura ambiente.

3. Solução Aquosa de Ácido Sulfúrico a 1% (v/v)

Armazenar à temperatura ambiente. Estável por um ano.

4. Solução Álcoólica (álcool etílico a 95%) de Azul-de-metileno a 0,3%

ou

5. Solução Alcalina de Azul-de-metileno (Solução de Loeffler)

Azul-de-metileno	0,3g
Álcool etílico a 95% (etanol)	30ml
Hidróxido de potássio diluído (KOH) (0,01%)	100ml

Armazenar à temperatura ambiente. Estável por um ano.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.

2. Preparar o esfregaço com fezes frescas ou preservadas. As amostras fecais formolizadas poderão ser concentradas pela centrifugação (500 X *g*/10min).

3. Deixar secar à temperatura ambiente. Fixar com álcool metílico por um minuto e deixar secar à temperatura ambiente.

4. Corar com o corante de Kinyoun (a frio) por três a cinco minutos.

5. Escorrer o corante e lavar com solução aquosa de álcool etílico a 50% (três a cinco segundos).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

6. Lavar com água corrente.

7. Diferenciar com solução aquosa de ácido sulfúrico a 1% por dois minutos ou até que o corante cesse de escorrer da lâmina.

8. Lavar com água corrente. Deixar escorrer.

9. Corar o fundo da preparação com solução alcoólica de azul-de-metileno a 0,3% por um minuto.

10. Lavar com água corrente e secar. Montar com resina sintética (*Cytoseal* 60).

Observação: Cubas de *Coplin* poderão ser usadas nas diferentes fases do processo de coloração.

Características da Coloração

Os oocistos do *C. parvum* e *I. belli* apresentam coloração do rosa ao vermelho, ao púrpura intenso. Alguns dos quatro esporozoítos podem ser vistos nos oocistos do *Cryptosporidium*. Os oocistos imaturos da *Isospora* aparecem corados, enquanto os oocistos maduros mostram os dois esporocistos corados, usualmente do rosa ao púrpura, com uma zona clara entre os esporocistos corados e a parede do oocisto. O fundo da preparação é corado em azul. Os organismos presentes freqüentemente apresentam, entre eles, uma intensidade de cor variável. Quando presentes, os oocistos de *Cyclospora cayetanensis* com tamanho de aproximadamente 10µm, assemelham-se aos do *C. parvum*, os oocistos não apresentam morfologia interna bem definida e a intensidade de cor tende a ser mais variável do que aquela vista no *Cryptosporidium* e na *Isospora*. Quando o paciente for portador de uma grande infecção com microsporídios (doente imunocomprometido) pequenos esporos (1 a 2µm) poderão ser vistos, mas não serão facilmente identificados como as bactérias e as pequenas células de leveduras[51] (Figs. 10.7 e 10.8).

Coloração de Giemsa

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas) ou preservado na solução salina de formaldeído a 10% ou no fixador acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF).

Observações

Ver Capítulo 12 “Exame do Sangue”: Reagentes, Preparação das Soluções, Coloração da Amostra e Controle de Qualidade.

Características da Coloração

O *Cryptosporidium* é ligeiramente menor (4-5µm). O citoplasma é granulado, a coloração varia do rosa ao violeta-escuro, com a zona central mais

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

clara. Os corpos residuais são bem marcados em posição lateral, os esporozoítos coram-se de vermelho-escuro. Certas formas não ficam coradas e são dificilmente identificadas. As leveduras com o mesmo tamanho, muitas vezes ovóides, coram-se em azul[24].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anderson BC. Patterns of shedding of criptosporidial oocysts in Idaho calves. J Am Med Assoc, 178:982-984, 1978.
2. Anderson BC. Cryptosporidiosis. Lab Med, 14:55-56, 1983.
3. Angus KW, Campbell L, Gray EW et al. Staining of fecal yeasts and Cryptosporidium oocysts. Vet Rec, 108:173, 1981.
4. Arrowood MJ, Sterling CR. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopyonic Percoll gradients. J Parasitol, 73:314-319, 1987.
5. Asahi H, Kumada M, Kato K et al. A simple staining method for cryptosporidian oocysts and sporozoites. Jap J Med Sci Biol, 41:117-121, 1988.
6. Ash LR, Oriehl TC. Atlas of Human Parasitology. 4th ed. Chicago (Ill): ASCP Press, 1997.
7. Ashford RW. Occurence of a undescribed coccidian in man in Papu New Guinea. Ann Trop Med Parasitol, 73:479-500, 1979.
8. Baxby D, Blundell N, Hart C. The development and performance of a simple sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in feces. J Hyg, 93:317-323, 1984.
10. Baxby D, Getty B, Blundell N et al. Recognition of whole *Crytosporidium* oocysts in feces by negative staining and electron microscopy. J Clin Microbiol, 19:566-567, 1984.
11. Berlin OGW, Novak SM, Porschen RK et al. Recovery of *Cyclospora* organisms from patients with prolonged diarrhea. Clin Infect Dis, 18:606-609, 1994.
12. Berlin OGW, Conteas CN, Sowerby TN. Detection of *Isospora* in the stools of AIDS patientes using a new rapid autofluorescence technique. AIDS, 10:442-443, 1996.
13. Berlin OGW, Peter JB, Gagne C et al. Autofluorescence and detection of *Cyclospora* oocysts. Emerg Inf Dis, 4:127-128, 1998.
14. Bronsdon MA. Rapid dimethyl sulfoxide-modified acid-fast stain of *Cryptosporidium* oocysts in stool specimens. J Clin Microbiol, 19:952-953, 1984.
15. Bruckner DA. Microscopic Examination of Fecal Specimens: Iron Hematoxylin Stain (Modified Spencer-Monroe) In: Isenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.3.7.1-7.3.7.5. v.2, 1992.
16. Bullock-Iacullo S. Giemsa stain. In: Isenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.8.4.1-7.8.4.6. v.2, 1992.
17. Casemore DP, Armstrong M, Jackson B. Screening for *Cryptosporidium* in stools. Lancet, i:734-735, 1984.
18. Chichino G, Bruno A, Cevini C et al. New rapid staining methods of *Cryptosporidium* oocysts in stools. J Protozool, 38(Suppl):212S-214S, 1991.
19. Clarke SC. Laboratory diagnosis and autofluorescence of *Cyclospora*. Br J Biomed Sci, 52:231, 1996.
20. Clarke SC, McTibtyre M. Incidental laboratory diagnosis of *Cyclospora cayetanensis*. Br J Biomed Sci, 53:243, 1996.
21. Collins R. Protozoan parasites of the intestinal tract: A review of Coccidia and Microsporida. JAOA, 97:593-598, 1997.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

22. Cross RF, Moorhead PD. A rapid staining technique for cryptosporidia. Moder Vet Pract, 65:307, 1984.

23. Current WL. Human cryptosporidiosis. N Engl J Med, 309:1326-1327, 1983.

24. Current WL. Techniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium*. In: Dubey JP, Speer CA, Fayer R eds. Cryptosporidiosis of Man and Animals. Boca Raton (Fla): CRC Press, 31-49, 1990.

25. Deluol AM, Cenac J, Matheron S et al. La cryptosporidiose. II. Diagnostic biologique. Ann Biol Clin, 42:399-405, 1984.

26. Eberhard ML, Pieniazek NJ, Arrowood MJ. Laboratory diagnosis of *Cyclospora* infections. Arch Pathol Lab Med, 212:792-797, 1997.

27. Fayer R, Ugar BLP. Cryptosporidium spp., and cryptosporidiosis. Microbiol Ver, 50:458-483, 1986.

28. Garcia LS, Bruckner DA, Brewer TC et al. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* stool specimen. J Clin Microbiol, 18:185-190, 1983.

29. Garcia LS, Shimizu RY. Diagnostic parasitology: An overview of topics. Lab Med, 24:13-18, 1993.

30. Garcia LS, Shimizu RY. Diagnostic parasitology: Parasitic infections and the compromised host. Lab Med, 24:205-215, 1993.

31. Garcia, LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3nd ed. Washington (DC): ASM Press, 1997.

32. González-Ruiz A, Bendall RP. Size Matters: The use of the ocular micrometer in diagnostic parasitology. Parasitol Today, 11:83-85, 1995.

33. Hafiz S, Spencer RC, Lee M et al. Use of microwave for acid and alcohol fast staining. J Clin Pathol, 38:1073-1076, 1985.

34. Heine VJ, Boch J. Kryptosporidien-infektionem beim Kalb Nachweis, votkommen und experimentelle Ubertragung. Berl Muench Tieraerztl Wochenschr, 94:289-292, 1981.

35. Heine J. An easy technique for the demonstration of cryptosporidia in faeces. Zbl Vet B, 29:324-327, 1982.

36. Henriksen S, Pohlenz J. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. Acta Vet Scand, 22:594-596, 1981.

37. Kageruka P, Brandt JRA, Taelman H et al. Modified Koster staining method for the diagnosis of cryptosporidiosis. Ann Soc Belge Med Trop, 64:171-175, 1994.

38. Kawamoto F, Mizuno S, Fujioka H et al. Simple and rapid staining for detection of *Entamoeba* cysts and other protozoan with fluorochrome. J Med Sc Biol, 40: 35-46, 1987.

39. Ma P, Soave R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. J Infec Dis, 147:824-828, 1983.

40. Ma P. *Cryptosporidium*-Biology and diagnosis. Adv Exp Med Biol, 202:135, 1986.

41. Milacek P, Vitovec J. Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbolmethyl violet and tartazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. Folia Parasitol, 32:50, 1985.

42. Miller JM. Quality control of media, reagents, and stains. In: Ballows A, Hausler Jr WJ, Herrmann KL et al. editores. Manual of Clinical Microbiology. 5th ed. Washington (DC): ASM Press, 1203-1225, 1991.

43. O' Donoghue PJ. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in man and animals. Int J Parasitol, 25:139-195, 1995.

44. Ortega YR, Sterling CR, Gilman RH, et al. *Cyclospora* species — a new protozoan pathogen of humans. N Engl J Med 1993; 328:1308-1312.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

45. Ortega YR, Gilman RH, Sterling CR. A new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeridae) from humans. J Parasitol, 80:625-629, 1994.

46. Ortega YR, Sterling CR, Gilman RH. *Cyclospra cayetanensis*. Adv Parasitol, 40:399-418, 1998.

47. Palmer J. Modified iron hematoxylin/Kinyoun stain. Clin Microbiol News, 13:39-40, 1991. (Letter)

48. Payne P, Lancaster LA, Heinzman M, et al. JA. Identification of *Cryptosporidium* in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. N Engl J Med, 309:613-614, 1983.

49. Pieniazek NJ, Slemenda SB, da Silva AJ, et al. PCR confirmation of infection with *Cyclospora cayeranensis*. Emerg Infect Dis, 2:342-343, 1996.

50. Pohjola S. Negative staining method with nigrosin for the detection of cryptosporidial oocysts-a comparative study. Res Vet Sci,36:217-219, 1984.

51. Pohjola S, Jokipii L, Jokipii A. Dimethyl-sulphoxide-Ziehl-Neelsen technique for detection of cryptosporidial oocysts. Vet Rec, 115:442-443, 1985.

52. Shimizu RY. Special stains for coccidia and cyanobacterium-like bodies: Modified Kinyoun's acid-fast stain (cold). In: Isenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.4.1.1-7.1.1.3. v.2, 1992.

53. Shimizu RY. Special stains for coccidia and cyanobacterium-like bodies: Modified Ziehl-Neelsen acid-fast stain (hot). In: Isenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.4.2.1-7.1.2.4. v.2, 1992.

54. Smith WJ, Barlett MS. Diagnostic parasitology: introduction and methods. In: Ballows A, Hausler WJ Jr, Herrmann KL et al. editores. Manual of Clinical Microbiology. 5th ed. Washington (DC): ASM Press, 701-716, 1991.

55. Soave R. *Cyclospora*. Inf. Dis. Clin. North Amer, 12:1-2, 1998.

56. Spencer FM, Monroe LS. The Color Atlas of Intestinal Parasites. Springfield (Ill): Charles C. Thomas, Publisher; 1968.

57. Sterling CR, Arrowood M. Cryptosporidia. In: Kreier JP ed. Parasitic Protozoa. 2nd ed. New York (NY): Academic Press, 159-213. v.6, 1992.

58. Terra L, Pellicano S, Milano M. Diagnosi di laboratori delle microparassitosi intestinali in pazienti affeti da AIDS: stato dell`arte. Minerva Med, 89:23-27, 1998.

59. Tzipori S, Angus KW, Gray EW et al. Vomiting and diarrhea associated with cryptosporidial infection. N Eng J Med, 303:818, 1980.

60. Ungureanu EM, Dontu GE. A new staining technique for the identification of *Cryptosporidium* oocysts in faecal smears. Trans R Soc Trop Med Hyg, 86:638, 1992.

61. Visvesvara GS, Moura H, Kovacs-Nace E et al. Uniform staining of *Cyclospora* oocysts in fecal smears by a modified safranin technique with microwave heating. J Clin Microbiol, 35:730-733, 1997.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Capítulo 11



Métodos de Coloração para Microsporídios Intestinais

Geraldo Attilio De Carli
Hércules Moura

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os microsporídios que parasitam o homem pertencem ao filo Microsporidia e à ordem Microsporida[17]. Nesse filo estão classificados mais de 100 gêneros e aproximadamente 1.000 espécies[3]. Esses organismos são parasitos intracelulares obrigatórios dos vertebrados e invertebrados, caracterizados pela produção de esporos e pela presença do túbulo polar. A infecção da célula hospedeira se inicia quando um estímulo apropriado determina a expulsão do túbulo polar (Fig. 11.1), o qual penetra na membrana da célula hospedeira, permitindo a libertação do esporoplasma no interior da célula[23] (Fig.11.2).

As fases subseqüentes da reprodução e da formação dos esporos termina com a ruptura da célula hospedeira e a libertação dos esporos[22]. As infecções humanas são adquiridas pela ingestão de pequenos esporos ovóides[3,16]. Os microsporídios infectam insetos, peixes e mamíferos[8,9,14,16]. O relato de casos de microsporidiose humana antes de 1985 eram extremamente raros. Atualmente existe uma emergente evidência da ligação dos microsporídios com as doenças em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e de sua seqüela, a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS)[2,7,14,20-22].

O *Enterocytozoon bieneusi* foi descrito por Desportes e cols.[7]. Esse organismo produz um pequeno esporo (0,8 x 1,5µm)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

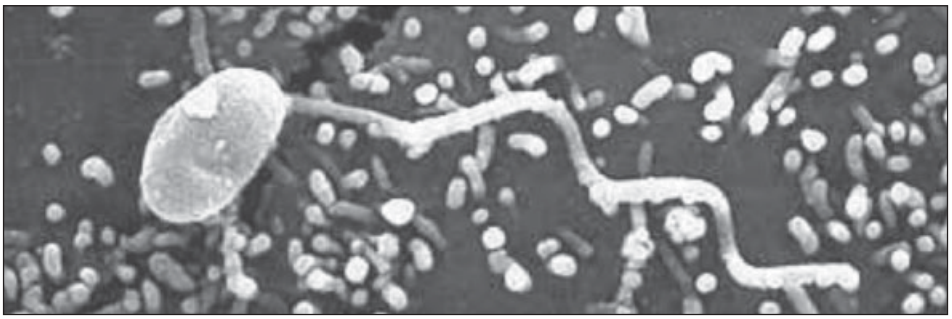


Fig. 11.1 — *Microfotografia pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) de esporo de microsporídio com o túbulo polar inserido na célula eucariótica. (Cortesia de DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis.)*

e se constitui no mais importante agente de diarréia em pacientes aidéticos (Tabela 11.1). Estima-se que o *E. bieneusi* pode ser a causa de 6,5% a 27% de todas as diarréias crônicas nesses pacientes. Estudos subseqüentes mostraram que o *Enterocytozoon bieneusi* pode colonizar além dos enterócitos do intestino delgado[6], do epitélio do canal biliar e do pulmão[22]. Em 1993, Cali, Kotler e Orenstein[5], descreveram a *Septata intestinalis* como um novo gênero e nova espécie. Hartskeerl e cols.[13] reclassificaram esse microsporídio para o gênero *Encephalitozoon*, passando a ser descrito como *Encephalitozoon intestinalis*. Oito gêneros de microsporídios estão relacionados com essas infecções, mas somente as espécies *Enterocytozoon bieneusi* e *Encephalitozoon intestinalis* permanecem como parasitos intestinais, apesar da *Encephalitozoon intestinalis* se disseminar através de outros tecidos[1,4,14,24]. Os outros três gêneros (*Nosema*, *Encephalitozoon* e *Pleistophora*) são encontrados em vários tecidos[14,16]. Os espécimes nos quais

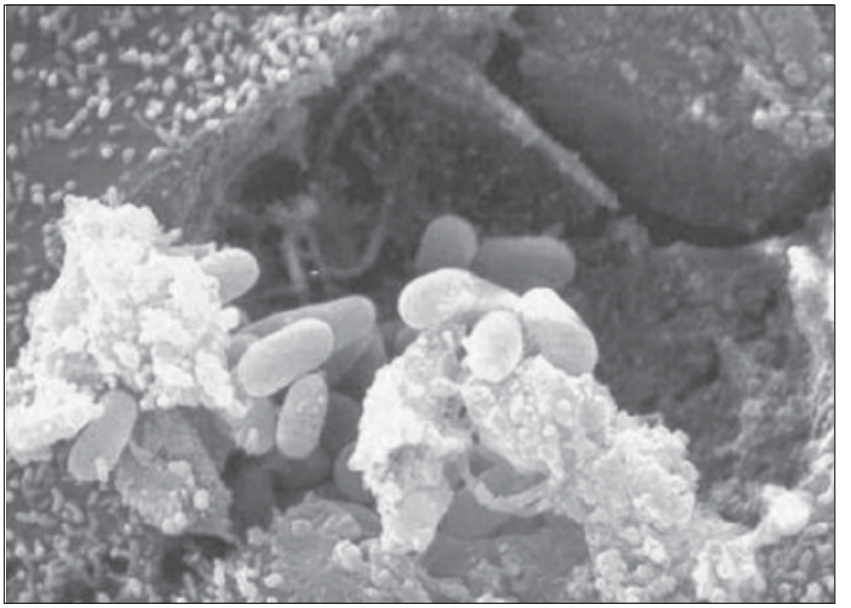


Fig. 11.2 — *Microfotografia pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) mostrando a célula eucariótica em colapso e esporos livres de* Encephalitozoon hellem *no meio extracelular. (Cortesia de DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

os microsporídios são diagnosticados incluem: urina, escarro, lavado broncoalveolar, líquido biliar, aspirado duodenal e fezes. Os organismos são também identificados em coletas e raspagens de tecidos da mucosa sinovial, córnea, conjuntiva e secreção nasal, além de biópsias traqueobronquial, do intestino delgado, da bexiga, do seio paranasal, do fígado, dos músculos e em colecistectomia[3].

O diagnóstico da microsporidiose intestinal (*Enterocytozoon bieneusi* e *Encephalitozoon intestinalis*) é realizado pela detecção dos esporos. A determinação da espécie causal dessa parasitose, com freqüência, é realizada pela microscopia eletrônica, dependendo desta maneira de procedimentos invasivos (amostras de biópsia ou de autópsia). A maioria dos corantes histológicos não coram os microsporídios[4]. Os microsporídios, apesar de estarem localizados nos tecidos, não provocam uma resposta inflamatória importante, podendo os mesmos passar despercebidos no exame das amostras histológicas[23].

No diagnóstico da microsporidiose intestinal os esporos podem ser detectados nas fezes, mas seu pequeno tamanho e sua similaridade com pequenas bactérias, torna a visualização dos esporos uma tarefa muito difícil. As amostras e os procedimentos usados para a coloração e identificação desses organismos são: a) tecidos de biópsias: métodos derivados de Ziehl-Neelsen, Giemsa, prata-metenamina, ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina-eosina (HS), além da microscopia eletrônica; b) fezes: método do tricrômico modificado e microscopia eletrônica[3,9,12,14,19,25].

Entre os procedimentos descritos para detectar esporos de microsporídios incluem-se os métodos de Giemsa, azul de toluidina, Gram, ácido periódico de Schiff, C*hromotrope* 2R e suas modificações[10,11,15,18,19,22,28]. Também são usados para a detecção dos esporos agentes quimiofluorescentes[26,28] e anticorpos mono e policlonais[23,27,30]. O método modificado do tricrômico de Weber e cols.[28] fornece características diferenciais da coloração dos esporos, as quais tornam mais fácil a detecção dos microsporídios nas fezes e nos líquidos orgânicos, tornando-se o método padrão de coloração. Algumas modificações foram incluídas ao procedimento padrão de Weber[28].

Ryan e cols.[22] descreveram que a redução da quantidade do ácido fosfotúngstico e a substituição da anilina azul pelo *fast green* na coloração original resultou em melhor contraste dos esporos com o fundo da coloração mais claro. Kokoskin e cols.[15] descreveram que 10 minutos de exposição para o *Chromotrope* 2R, corante-chave no método de Weber a 50°C, não eram suficientes para a visualização dos esporos, como também a redução do tempo total de coloração do procedimento de 120 para 40 minutos.

Os esporos são resistentes e não se coram satisfatoriamente pela hematoxilina férrica, são ocasionalmente ácido-resistentes à fucsina-fenicada e quando corados pelo ácido periódico de Schiff (PAS-positivo) apresentam um grânulo polar na extremidade anterior[4,9,10,12]. Os esporos dos microsporídios têm uma evidente afinidade para a coloração de Gram[18,19]. A coloração de Gram-*Chromotrope* tem sido usada para a detecção de esporos de microsporídios em amostras clínicas (fezes, urina, escarro, saliva e sobrenadante de cultura de células)[18,19,27]. Moura e cols.[18,19] descreveram um

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

novo e excelente procedimento para a coloração de esporos de microsporídios em amostras clínicas, independente da origem, pela combinação da coloração de Gram e o método de Weber. Os estágios de diagnóstico (esporos) são muito pequenos (1 a 4μm), mas são visíveis em cortes histológicos e em espécimes fecais, quando corados por diferentes corantes e observados pela microscopia óptica. A identificação verdadeira das espécies pode depender da microscopia eletrônica, dos anticorpos fluorescentes (Fig. 11.3) ou da reação em cadeia da polimerase (PCR). A morfologia comparada entre os estágios de diagnóstico dos microsporídios e dos coccídios é apresentada na forma de diagrama (Fig. 10.1).

Coloração pelo *Chromotrope* (Tricrômico Modificado) (Weber-Verde)

Um novo *chromotrope* básico, utilizado na coloração de amostras fecais frescas ou formolizadas, observado pela microscopia de fundo claro, mostrou-se eficiente para a coloração e identificação dos esporos. A quantidade do corante *Chromotrope* 2R é maior do que a usada anteriormente na coloração pelo tricrômico modificada por Wheatley, como também é mais longo o tempo de coloração (90 minutos)[28]. Esse método foi desenvolvido no *National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), Atlanta, Georgia, EUA, usando vários componentes do método de coloração do tricrômico para diferenciar os esporos dos microsporídios dos elementos fecais do fundo da preparação.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas) ou fezes preservadas em solução de formaldeído 5-10% ou no fixador acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF). Agitar vigorosamente a mistura de fezes e preservador.

Reagentes

1. *Chromotrope* 2R (CI 16570) ($C_{16}H_{10}N_2Na_2O_8S_2$)
2. *Fast green* (CI 42053) ($C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3$)
3. Acetato de sódio ($C_2H_3O_2Na.3H_2O$)
4. Ácido fosfotúngstico ($24WO_3.2H_3PO_4.48H_2O$)
5. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
6. Álcool etílico absoluto (C_2H_6O)
7. Álcool etílico a 90% (C_2H_6O)
8. Álcool etílico a 95% (C_2H_6O)
9. Álcool metílico absoluto (CH_4O)
10. Formaldeído 37-40% (HCHO)
11. Xilol (C_8H_{1O}) ou Hemo-De
12. Meio de montagem (*Cytoseal* 60)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

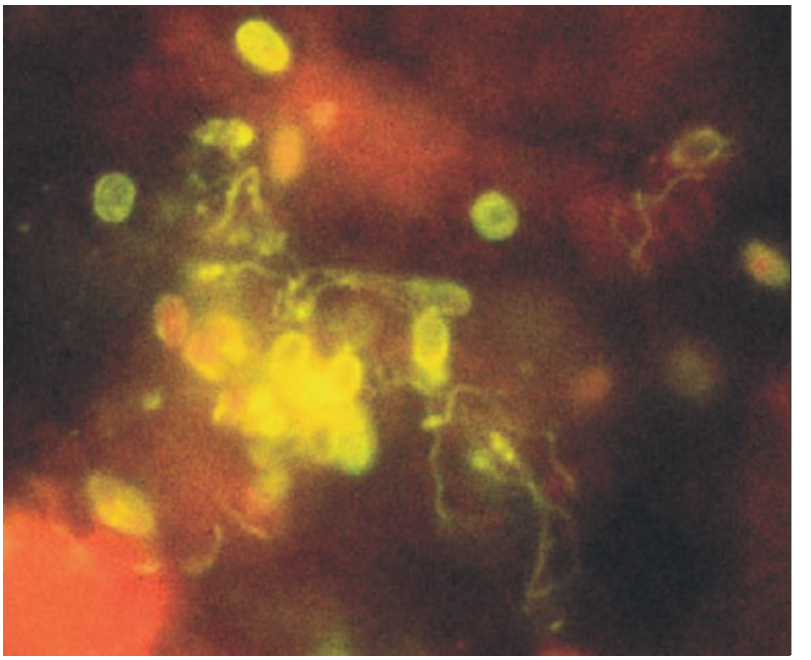


Fig. 11.3 — *Identificação de* Encephalitozoon hellem *pela imunofluorescência (anticorpos monoclonais). Presença de esporos em amostra de lavado broncoalveolar de paciente com SIDA/AIDS. Observar os esporos em brilhante fluorescência nos quais os túbulos polares foram expulsos. (Cortesia de DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

Preparação das Soluções

1. Corante Modificado de Tricrômico para Microsporídios

Chromotrope 2R	6g*
Fast green	0,15g
Ácido acético glacial	3ml
Ácido fosfotúngstico	0,7ml
Água destilada-deionizada	100ml

*10 vezes maior do que na fórmula original do tricrômico.

Tabela 11.1
Microsporídios Intestinais: Estágio de Diagnóstico, Forma, Número de Túbulos Polares e Tamanho[10,15]

Espécie	*Estágio de Diagnóstico*	*Forma*	*Número de Túbulos Polares*	*Tamanho (μm)*
Enterocytozoon bieneusi	Esporo	Esférico ou oval	4-7	0,8 x 1,5
Encephalitozoon intestinalis	Esporo	Esférico ou oval	4-7	1,2 x 2,0

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

a. Dissolver o *Chromotrope* 2R e o *Fast green* em 3ml de ácido acético glacial e adicionar o ácido fosfotúngstico. Agitar vigorosamente e deixar a mistura em repouso por 30 minutos, à temperatura ambiente.

b. Adicionar 100ml de água destilada-deionizada ao corante, o qual deverá apresentar uma cor púrpura forte quase preta.

c. Armazenar o corante em frasco de plástico ou em frasco de vidro com tampa esmerilhada. A solução corante é estável por um mês.

2. Solução de Ácido-Álcool (v/v)

Álcool etílico a 90%	995,5ml
Ácido acético glacial	4,5ml

• Adicionar o ácido acético ao álcool etílico e estocar em frasco de vidro com tampa esmerilhada. Conservação indefinida.

3. Solução de Formaldeído a 5 e 10% (v/v)

Formaldeído 37-40%	5ml	10ml
Água destilada-deionizada	95ml	90ml

• Misturar o formaldeído com a água.

4. Fixador Acetato de Sódio-Ácido Acético-Formaldeído (SAF)

Acetato de sódio	1,5g
Ácido acético glacial	2ml
Formaldeído 37-40%	4ml
Água destilada-deionizada	92,5ml

• Misturar em um *beaker* os componentes. Estocar o fixador em frasco de plástico ou em frasco de vidro com tampa esmerilhada.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.

2. Usando uma alíquota de 10µl de fezes frescas (não concentradas) ou preservadas (formalina a 5-10% ou SAF), preparar o esfregaço pela extensão do material em uma área total de 45 por 25mm.

3. Deixar secar à temperatura ambiente.

4. Fixar com álcool metílico absoluto por cinco minutos.

5. Deixar secar à temperatura ambiente.

6. Imergir o esfregaço por 90 minutos no corante modificado do tricrômico.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

7. Escorrer o corante e lavar com solução ácido-álcool, por não mais de 10 segundos.

8. Imergir o esfregaço, várias vezes (3-4), em álcool etílico a 95%. (Essa etapa pode ser considerada como uma lavagem.)

9. Lavar com álcool etílico a 95% por cinco minutos.

10. Lavar com álcool etílico a 100% por 10 minutos.

11. Imergir em xilol por 10 minutos.

12. Montagem com resina sintética (*Cytoseal* 60).

13. Examinar os esfregaços com óleo de imersão (1.000X) e ler no mínimo 100 campos.

Observação: Cubas de *Coplin* devem ser usadas em todas as etapas do procedimento de coloração.

Características da Coloração

A parede dos esporos dos microsporídios apresenta coloração do rosa ao vermelho, com uma zona central clara, ou, eventualmente, mostrando uma faixa horizontal ou em diagonal, a qual representa o túbulo polar. As bactérias, células de leveduras e alguns artefatos coram-se de verde. Entretanto, algumas bactérias e artefatos coram-se de rosa-vermelho. O tamanho e a forma dos outros componentes fecais são de grande importância na diferenciação dos esporos de outras estruturas[12].

Coloração pelo *Chromotrope* ou Modificação de Ryan (Ryan-Azul)

O método de Weber e cols.[28,29] modificado por Ryan e col.[22] foi descrito com o objetivo de melhorar o contraste entre a coloração dos esporos e o fundo da preparação. Inúmeras variações do método modificado do tricrômico foram experimentadas para melhorar o contraste entre a coloração dos esporos e o fundo da preparação. A solução tricrômico-azul contrasta com a solução do tricrômico modificada por Weber e cols.[29] em dois aspectos: o ácido fosfotúngstico foi reduzido em aproximadamente 65% e o *fast green*, substituído pela anilina azul.

Amostra

Material fecal não preservado (fezes frescas) ou fezes preservadas em solução de formaldeído 5% a 10% ou no fixador acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF). Agitar vigorosamente a mistura de fezes e preservador.

Reagentes

1. *Chromotrope* 2R (CI 16570) ($C_{16}H_{10}N_2Na_2O_8S_2$)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

2. Anilina azul (C_6H_7N)
3. Ácido fosfotúngstico ($24WO_3.2H_3PO_4.48H_2O$)
4. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
5. Álcool etílico absoluto (C_2H_6O)
6. Álcool metílico absoluto (CH_4O)
7. Álcool etílico a 90%
8. Álcool etílico a 95%
9. Ácido clorídrico (HCl)
10. Formaldeído 37-40% (HCHO)
11. Xilol (C_8H_{1O}) ou Histol
12. Meio de montagem (*Cytoseal* 60)

Preparação das Soluções

1. Corante Tricrômico Modificado

Chromotrope 2R	6g*
Anilina azul	0,5g
Ácido acético glacial	3ml
Ácido fosfotúngstico	0,25ml
Água destilada-deionizada	100ml

pH 2,5

*10 vezes maior do que na fórmula original do tricrômico

a. Dissolver o *Chromotrope* 2R e a anilina azul em 3ml de ácido acético glacial e adicionar o ácido fosfotúngstico. Agitar vigorosamente e deixar a mistura em repouso por 30 minutos, à temperatura ambiente.

b. Adicionar 100ml de água destilada-deionizada ao corante.

c. Ajustar o pH em 2,5 com solução de HCl 1M.

d. Estocar o corante em frasco de plástico ou em frasco de vidro com tampa esmerilhada. Proteger a solução da luz. A solução corante é estável por um mês.

2. Solução de Ácido-Álcool (v/v)

Álcool etílico a 90%	995,5ml
Ácido acético glacial	4,5ml

• Adicionar o ácido acético ao álcool etílico e estocar em frasco de vidro com tampa esmerilhada. Conservação indefinida.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

3. Solução Um Molar (1M) de Ácido Clorídrico (v/v)

Ácido clorídrico concentrado	85ml
Água destilada-deionizada q.s.p.	1.000ml

• Misturar o HCl e a água e estocar em frasco de vidro com tampa esmerilhada. Conservação indefinida.

4. Solução de Formaldeído a 5% e 10% (v/v)

Formaldeído 37-40%	5ml	10ml
Água destilada-deionizada	95ml	90ml

• Misturar o formaldeído com a água.

5. Fixador Acetato de Sódio-Ácido Acético-Formaldeído (SAF)

Acetato de sódio	1,5g
Ácido acético glacial	2ml
Formaldeído 37-40%	4ml
Água destilada-deionizada	92,5ml

• Misturar em um *beaker* os componentes. Estocar o fixador em frasco de plástico ou em frasco de vidro com tampa esmerilhada.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
2. Usar uma alíquota de 10ml de fezes frescas (não concentradas) ou preservadas (formalina a 5% ou a 10%). Preparar o esfregaço pela extensão do material em uma área total de 45 por 25mm.
3. Deixar secar à temperatura ambiente.
4. Fixar com álcool metílico por 10 minutos.
5. Deixar secar à temperatura ambiente.
6. Imergir o esfregaço por 90 minutos no corante tricrômico-azul.
7. Escorrer o corante e lavar com solução álcool-ácido por 10 segundos.
8. Lavar com álcool etílico a 95% por 10 segundos.
9. Lavar com álcool etílico a 95% por cinco minutos.
10. Lavar com álcool etílico a 95% por cinco minutos.
11. Lavar com álcool etílico a 100% por 10 minutos.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

12. Imergir em xilol (Histol) por 10 minutos.

13. Montagem com resina sintética (*Cytoseal* 60).

14. Examinar os esfregaços com óleo de imersão (1.000X) e ler no mínimo 100 campos.

Observação: Cubas de *Coplin* devem ser usadas em todas as etapas do procedimento de coloração.

Características da Coloração

A parede dos esporos dos microsporídios apresenta coloração do rosa ao vermelho, com uma zona central clara ou, eventualmente, mostrando uma faixa horizontal em diagonal, a qual representa o túbulo polar. Essencialmente houve duas mudanças no método de Weber e cols.[28,29]. A redução do ácido fosfotúngstico em 65% permitiu melhor coloração do fundo da preparação, evitando sua descoloração. O *fast green* é muito tênue e desfalece rapidamente. Esse corante foi substituído pela anilina azul, a qual, na presença do ácido fosfotúngstico, torna-se um corante que não desbota. Outra vantagem é a coloração das leveduras e dos pseudomicélios em verde-azulado. Com uma fixação rápida dos esfregaços o contraste entre os esporos dos microsporídios, dos tecidos e das células dos fungos é muito bom, permitindo uma fácil identificação dessas classes de organismos. Entretanto, se os esfregaços forem preparados com fezes preservadas pelo fixador de Schaudinn ou pelo fixador álcool polivinílico (APV) os resultados serão insatisfatórios, devido a uma supracoloração. O corante tricrômico-azul é inadequado para amostras coradas com sangue e para material de autópsias, porque em ambos os espécimes os eritrócitos e os tecidos mal preservados coram-se fortemente com o *Chromotrope* 2R. O tamanho e a forma dos outros componentes fecais são de grande importância na diferenciação dos esporos de outras estruturas[12].

Colorações pelo Tricrômico Modificado (Weber-Verde e Ryan-Azul)

Controle de Qualidade

1. A única maneira de realizar o controle de qualidade (CQ) aceitável para esses métodos é usar esporos verdadeiros como controle dos organismos. Na maioria das vezes, a obtenção do controle positivo é muito difícil. O uso dos microrganismos é particularmente importante porque os esporos são dificilmente corados e muito pequenos (1 a 1,5μm).

2. Os esfregaços para CQ devem ser incluídos em todos os procedimentos de coloração, particularmente quando não são realizadas colorações com freqüência.

3. Usar no procedimento de coloração cubas de *Coplin* para evitar a evaporação das soluções.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

4. Conferir a aderência (macroscopicamente) dos espécimes à lâmina.

5. Quando os esfregaços forem corretamente fixados e corados, os esporos aparecem ovóides e refráteis, com a parede corada do rosa ao vermelho, com uma zona central clara ou, eventualmente, mostrando uma faixa horizontal ou em diagonal, a qual representa o túbulo polar.

6. As bactérias, células de leveduras e alguns artefatos coram-se de verde (Weber-verde) ou azul (Ryan-azul). Entretanto, algumas bactérias e artefatos coram-se de rosa-vermelho.

7. Os resultados desse método de coloração deverão ser reportados somente se o esfregaço-controle estiver bem corado[12].

Coloração pelo *Chromotrope* a Quente ou Modificação de Kokoskin (a Quente)

Esse procedimento de coloração de Kokoskin[15] apresenta mudanças na temperatura de aquecimento das lâminas (50°C) e no tempo de coloração (90 a 10 minutos). Garcia e Bruckner[12] recomendam substituir a temperatura ambiente pelo aquecimento a 50°C e o tempo de coloração em 10 minutos.

Amostra

Material fecal preservado em solução de formaldeído a 10%. Agitar vigorosamente a mistura de fezes e preservador.

Reagentes

1. *Chromotrope* 2R (CI 16570) ($C_{16}H_{10}N_2Na_2O_8S_2$)
2. *Fast green* (CI 42053) ($C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3$)
3. Ácido fosfotúngstico ($24WO_3.2H_3PO_4.48H_2O$)
4. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
5. Álcool metílico absoluto (CH_4O), livre de acetona
6. Álcool etílico absoluto (C_2H_6O)
7. Álcool etílico a 95% (C_2H_6O)
8. Formaldeído 37-40% (HCHO)
9. Xilol (C_8H_{1O})
10. Meio de montagem (*Cytoseal* 60)

Preparação das Soluções

1. Corante Tricrômico Modificado

Chromotrope 2R	9g
Fast green	0,22g

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Ácido acético glacial	4,5ml
Ácido fosfotúngstico	1,05ml
Água destilada-deionizada	150ml

a. Dissolver o *Chromotrope* 2R e o *Fast green* em 4,5ml de ácido acético glacial e adicionar o ácido fosfotúngstico. Agitar vigorosamente e deixar a mistura em repouso durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

b. Adicionar 150ml de água destilada-deionizada ao corante, o qual deverá apresentar cor púrpura forte quase preta.

c. Estocar o corante em frasco de plástico ou em frasco de vidro com tampa esmerilhada. A solução corante é estável por um mês.

2. Solução de Ácido-Álcool (v/v)

Ácido acético glacial	0,675ml
Álcool etílico a 95% q.s.p	150ml

3. Solução de Formaldeído a 10% (v/v)

Formaldeído 37-40%	10ml
Água destilada-deionizada	90ml

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.

2. Preparar um esfregaço, usando uma alíquota de 10µl de fezes preservadas (formalina a 10%), pela extensão do material em uma área total de 45 por 25mm.

3. Deixar secar à temperatura ambiente.

4. Fixar o esfregaço com álcool metílico durante cinco minutos.

5. Deixar secar à temperatura ambiente.

6. Corar com o corante tricrômico modificado, aquecendo a lâmina à temperatura de 50°C durante 10 minutos.

7. Escorrer o corante e lavar com solução álcool-ácido por 10 segundos.

8. Lavar com álcool etílico a 95% por 10 segundos.

9. Lavar com álcool etílico a 95% por cinco segundos.

10. Lavar com álcool etílico absoluto por 10 minutos.

11. Imergir em xilol por 10 minutos.

12. Montar com resina sintética (*Cytoseal* 60).

13. Examinar os esfregaços com óleo de imersão (1.000X) e ler no mínimo 100 campos.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Observação: Cubas de *Coplin* devem ser usadas em todas as etapas do procedimento de coloração.

Características da Coloração

A parede dos esporos dos microsporídios apresenta coloração do rosa ao vermelho, com uma zona central clara ou, eventualmente, mostrando uma faixa horizontal ou em diagonal, a qual representa o túbulo polar. O tamanho e a forma dos outros componentes fecais são de grande importância na diferenciação dos esporos de outras estruturas[12].

Coloração de Gram-*Chromotrope* para Microsporídios

Em 1996, Moura e cols. desenvolveram o método do Gram-*Chromotrope* para microsporídios, uma combinação da coloração de Gram e a coloração modificada do tricrômico[18,19,28] (Figs. 11.4 e 11.5).

Amostra

Fezes, urina, escarro, saliva, sobrenadante de cultura de células.

Reagentes

1. *Chromotrope* 2R (CI 16570) ($C_{16}H_{10}N_2Na_2O_8S_2$)
2. *Fast green* (CI 42053) ($C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3$)
3. Ácido fosfotúngstico ($24WO_3.2H_3PO_4.48H_2O$)
4. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
5. Acetona (C_3H_6O)
6. Álcool metílico (CH_4O)
7. Álcool etílico absoluto (C_2H_6O)
8. Álcool etílico 95% (C_2H_6O)
9. Éter etílico ($C_4H_{10}O$)
10. Cristal violeta (*Bacto Crystal violet*) (CI 42555) ($C_{25}H_{30}ClN_3$)
11. Hidrogenocarbonato de sódio ($NaHCO_3$)
12. Iodo, cristais (I_2)
13. Iodeto de potássio (KI)
14. Resina sintética (*Cytoseal* 60)

Nota: Os corantes do método de Gram podem ser adquiridos comercialmente da Fisher Scientific (*Gran Stain Kit* SD100).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Preparação das Soluções

1. Solução de Cristal Violeta (m/v)

Cristal violeta	1g
Água destilada-deionizada	100ml

• Colocar o cristal violeta em um gral e acrescentar lentamente a água. Deixar em repouso durante 24 horas e filtrar.

2. Solução de Hidrogenocarbonato de Sódio a 5% (m/v)

Hidrogenocarbonato de sódio	1g
Água destilada-deionizada	20ml

• Dissolver hidrogenocarbonato de sódio em água. Filtrar e estocar em frasco conta-gotas.

3. Solução de Lugol

Iodo	1g
Iodeto de potássio	2g
Água destilada-deionizada	300ml

• Dissolver o iodeto de potássio em água. Adicionar lentamente o iodo e agitar a mistura até a completa dissolução. Filtrar e estocar em frasco de cor âmbar com tampa esmerilhada, ao abrigo da luz.

4. Solução Ácido-Álcool (v/v)

Álcool etílico a 90%	995,5ml
Ácido acético glacial	4,5ml

• Adicionar o ácido acético ao álcool etílico e estocar em frasco de cor âmbar com tampa esmerilhada. Conservação indefinida.

5. Solução de Éter Etílico-Acetona (v/v)

Acetona	75ml
Éter etílico	25ml

• Misturar o éter etílico e a acetona e estocar em frasco de cor âmbar com tampa esmerilhada. Conservação indefinida.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

6. Solução de *Chromotrope*

Chromotrope 2R	6g
Fast green	0,15g
Ácido fosfotúngstico	0,7g
Ácido acético glacial	3ml
Água destilada-deionizada	100ml

• Colocar os ingredientes secos em um *beaker* e adicionar 3ml de ácido acético glacial. Agitar a mistura e deixar em repouso 30 minutos para "amadurecer". Adicionar 100ml de água. O corante é estável e não deve ser diluído.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.

2. Preparar um esfregaço delgado estirado (uma a duas gotas) com a amostra que deve ser corada. Deixar secar à temperatura ambiente.

3. Fixar o esfregaço pelo calor em chama baixa (três vezes por um segundo) ou cinco minutos no aquecedor de lâmina (*slide warmer*) à temperatura de 60°C. Deixar esfriar à temperatura ambiente. O esfregaço pode ser fixado com álcool metílico por três a cinco minutos.

4. Coloração pelo método de Gram

a. Cobrir o esfregaço durante dois minutos com a solução corante de cristal violeta a 1%, adicionada de três gotas de solução de hidrogenocarbonato de sódio a 5%.

b. Escorrer o excesso do corante e lavar com água corrente.

c. Imergir o esfregaço na solução de iodo de Gram por dois minutos.

d. Escorrer o excesso da solução de iodo de Gram e lavar com água corrente.

e. Diferenciar com a solução de éter etílico-acetona.

f. Lavar com água corrente.

5. Coloração pela solução corante do C*hromotrope*

a. Imergir o esfregaço na solução corante de C*hromotrope* por 10 minutos.

b. Imergir na solução de álcool-ácido por um a três segundos.

c. Lavar com álcool etílico a 95% por um minuto.

d. Lavar duas vezes, um minuto cada uma, com álcool etílico absoluto.

e. Deixar secar à temperatura ambiente ou no aquecedor de lâmina (*slide warmer*) por cinco minutos. Montar com resina sintética.

f. Examinar 200 a 300 campos do esfregaço com objetiva de imersão (100X).

Observação: Cubas de *Coplin* devem ser usadas em todas as etapas do procedimento de coloração.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Características da Coloração

A parede dos esporos dos microsporídios apresenta coloração do rosa pálido ao vermelho. As bactérias, células de leveduras e alguns artefatos coram-se de verde desmaiado.

Controle de Qualidade

1. A única maneira de realizar o controle de qualidade (CQ) aceitável para esse método é usar esporos verdadeiros como controle dos organismos. O uso dos microrganismos é particularmente importante porque os esporos são dificilmente corados e muito pequenos (1 a 1,5μm).

2. Os esfregaços para o controle de qualidade (CQ) devem ser incluídos em todos os procedimentos de coloração, particularmente quando não são realizadas colorações com freqüência.

3. Dependendo do número de esfregaços corados, não mais de 10 lâminas, as soluções subseqüentes à solução corante do *Chromotrope* devem ser trocadas para a obtenção de uma adequada lavagem e/ou desidratação.

4. Quando os esfregaços forem corretamente fixados e corados, os esporos aparecem ovóides e refráteis, com a parede corada do rosa ao vermelho, com uma zona central clara ou, eventualmente, mostrando uma faixa horizontal ou em diagonal, a qual representa o túbulo polar.

5. Usar cubas de *Coplin* no procedimento de coloração para evitar a evaporação das soluções.

Coloração Rápida a Quente pelo Gram-*Chromotrope*

Este procedimento foi desenvolvido por Moura e cols. (19) para a detecção de esporos de microsporídios em amostras clínicas. (Figs. 11.4 e 11.5)

Amostra

Fezes, urina, escarro, saliva, sobrenadante de cultura de células.

Reagentes

1. *Chromotrope* 2R (CI 16570) ($C_{16}H_{10}N_2Na_2O_8S_2$)
2. *Fast green* (CI 42053) ($C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3$)
3. Ácido fosfotúngstico ($24WO_3.2H_3PO_4.48H_2O$)
4. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
5. Acetona (C_3H_6O)
6. Álcool etílico a 95% (C_2H_6O)
7. Álcool etílico absoluto (C_2H_6O)
8. Cristal violeta (*Bacto Crystal violet*) (CI 42555) ($C_{25}H_{30}ClN_3$)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

9. Iodo, cristais (I_2)
10. Iodeto de potássio (KI)
11. Resina sintética (*Cytoseal* 60)

Preparação das Soluções

1. Solução de Cristal Violeta (m/v)

Cristal violeta	1g
Água destilada-deionizada	100ml

• Dissolver o cristal violeta em água. Filtrar e estocar em frasco conta-gotas de cor âmbar, ao abrigo da luz.

2. Solução de Lugol

Iodo	1g
Iodeto de potássio	2g
Água destilada-deionizada	300ml

• Dissolver o iodeto de potássio em água. Adicionar lentamente o iodo e agitar a mistura até a completa dissolução. Filtrar e estocar em frasco conta-gotas de cor âmbar, ao abrigo da luz.

3. Solução de Álcool Etílico-Acetona (1:1) (v/v)

Álcool etílico a 95%	100ml
Acetona	100ml

4. Solução Ácido-Álcool (v/v)

Álcool etílico a 90%	995,5ml
Ácido acético	4,5ml

• Adicionar o ácido acético ao álcool etílico e estocar em frasco de vidro com tampa esmerilhada. Conservação indefinida.

5. Solução de *Chromotrope*

Chromotrope 2R	1g
Fast green	0,15g

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Ácido fosfotúngstico	0,25g
Ácido acético glacial	3ml
Água destilada-deionizada	100ml

• Colocar os ingredientes secos em um *beaker* e adicionar 3ml de ácido acético glacial. Agitar a mistura e deixar em repouso 30 minutos para "amadurecer". Adicionar 100ml de água. O corante é estável e não deve ser diluído.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.

2. Preparar esfregaço delgado estirado com as amostras que deverão ser coradas. Deixar secar à temperatura ambiente.

3. Fixar o esfregaço pelo calor em chama baixa (três vezes por um segundo em chama baixa ou cinco minutos em aquecedor de lâmina a 60°C (*slide warmer*). Deixar esfriar à temperatura ambiente antes de corar.

4. Coloração pelo método de Gram (excluir a etapa da safranina)

a. Imergir o esfregaço na solução corante de cristal violeta por 30 segundos.

b. Escorrer o excesso do corante e lavar com água corrente.

c. Imergir o esfregaço na solução de lugol de Gram por 30 segundos.

d. Escorrer a solução de iodo de Gram e lavar com solução de álcool etílico-acetona até que a solução diferenciadora escorra do esfregaço incolor.

e. Lavar o esfregaço com água corrente fria para remover o excesso da solução diferenciadora.

5. Coloração pela solução de *Chromotrope*

a. Imergir o esfregaço na solução quente do corante de *Chromotrope* (50°C a 55°C) por um minuto.

b. Lavar na solução de álcool-ácido por um a três segundos.

c. Lavar em álcool etílico a 95% por 30 segundos.

d. Lavar duas vezes, 30 segundos cada uma, em álcool etílico a 100%. (Colocar o álcool etílico em duas cubas de *Coplin* diferentes).

e. Deixar secar à temperatura ambiente.

f. Montar em resina sintética (*Cytoseal* 60).

g. Examinar 200 a 300 campos do esfregaço com objetiva de imersão (100X).

Observações

1. Cubas de *Coplin* devem ser usadas em todas as etapas do procedimento de coloração.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Moura e cols.[19] recomendam para cortes de tecidos montados em parafina, lavar rapidamente a preparação na solução de álcool etílico a 50% + xilol a 50% (1:1) por 15 segundos e após em xilol a 100% por 15 minutos, antes de montar com *Cytoseal* 60 e sem deixar a preparação secar.

Características da Coloração

Os esporos dos microsporídios aparecem ovóides, de coloração violeta intensa sobre o fundo claro da preparação. Depois da coloração rápida a quente pelo método do Gram-*Chromotrope*, os espécimes fecais corados, contendo *Encephalitozoon intestinalis* e *Entercytozoon bieneusi*, podem ser separados em dois grupos, baseados no tamanho dos esporos. As leveduras aparecem coradas em rosa-vermelho, sendo facilmente diferenciadas dos esporos dos microsporídios. As bactérias coram-se fracamente pelo corante e não são confundidas com os esporos dos microsporídios.

Coloração pelo *Chromotrope*

Esse método de coloração foi desenvolvido no *Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* Atlanta, Georgia, EUA, usando vários componentes do método da coloração do tricrômico para diferenciar esporos de microsporídios dos elementos fecais do fundo da preparação.

Reagentes

1. *Chromotrope* 2R (CI 16570) ($C_{16}H_{10}N_2Na_2O_8S_2$)
2. *Fast green* (CI 42053) ($C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3$)
3. Ácido fosfotúngstico ($24WO_3.2H_3PO_4.48H_2O$)
4. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
5. Álcool etílico absoluto 100% (C_2H_6O)
6. Álcool etílico a 90%
7. Álcool etílico a 95%
8. Álcool metílico (CH_4O)
9. Resina sintética (*Cytoseal* 60)

Preparação das Soluções

1. Solução de *Chromotrope*

Chromotrope 2R	6g
Fast green	0,15g
Ácido fosfotúngstico	0,75g
Ácido acético glacial	3ml
Água destilada-deionizada	100ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

• Colocar os ingredientes secos em um *beaker* e adicionar 3ml de ácido acético glacial. Agitar a mistura e deixar em repouso 30 minutos para "amadurecer". Adicionar 100ml de água. O corante é estável e não deve ser diluído.

2. Solução Álcool-Ácido (v/v)

Álcool etílico a 90%	995,5ml
Ácido acético	4,5ml

• Adicionar o ácido acético ao álcool etílico e estocar em frasco de vidro com tampa esmerilhada. Conservação indefinida.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.

2. Preparar esfregaço delgado estirado com a amostra que deverá ser corada. Deixar secar à temperatura ambiente.

3. Fixar o esfregaço com álcool metílico durante três a cinco minutos.

4. Imergir o esfregaço na solução corante de *Chromotrope* por 90 minutos.

5. Lavar com solução álcool-ácido por um a três segundos.

6. Lavar por imersão em álcool etílico a 95%.

7. Lavar duas vezes, um minuto cada uma, em álcool etílico a 100%.

8. Deixar secar à temperatura ambiente.

9. Montar em resina sintética.

10. Examinar 200 a 300 campos do esfregaço com objetiva de imersão (100X).

Observação: Cubas de *Coplin* devem ser usadas em todas as etapas do procedimento de coloração.

Características da Coloração

A parede dos esporos dos microsporídios apresenta coloração do rosa pálido ao vermelho, medindo aproximadamente 1μm.

Controle de Qualidade

1. Incluir ao método de coloração uma lâmina-controle com microsporídios preparada com amostra fecal preservada pela solução salina de formaldeído a 10%.

2. Dependendo do número de esfregaços corados, não mais de 10 lâminas, as soluções subseqüentes à solução corante do *Chromotrope* devem ser trocadas para a obtenção de uma adequada coloração.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

3. Devido às dificuldades encontradas no diagnóstico desse pequeno esporo, é recomendada a pesquisa e a confirmação dos resultados positivos por um segundo microscopista.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

REVISÃO: COLORAÇÕES PELO TRICRÔMICO MODIFICADO PARA A COLORAÇÃO DE MICROSPORÍDIOS

Princípio: Produzir contraste de coloração entre os artefatos do fundo da preparação e os parasitos presentes; permitir o exame e o reconhecimento das características dos organismos através de objetiva de imersão (objetiva de 100X, totalizando um aumento de 1.000X). Indicado para identificar e diagnosticar esporos de microsporídios. A parede celular dos esporos dos microsporídios apresenta coloração do rosa ao vermelho, com uma zona central clara ou, eventualmente, mostrando uma faixa horizontal em diagonal, a qual representa o túbulo polar. Alguns esporos são observados através do exame com óleo de imersão (1.000X de aumento).

Amostra: Amostras fecais frescas ou preservadas pelo formaldeído ou SAF.

Reagentes: A coloração do tricrômico modificada (usando alta concentração de *Chromotrope* 2R) e soluções associadas; soluções desidratantes (álcoois e xilol); resinas sintéticas ou bálsamo-do-canadá.

Exame: Examinar no mínimo 200 a 300 campos com objetiva de imersão; um número adicional de campos pode ser requerido se um organismo suspeito não foi claramente identificado como ácido-resistente.

Resultados: O reconhecimento e a identificação de esporos de microsporídios torna-se muito difícil devido ao pequeno tamanho dos organismos. O diagnóstico final de laboratório depende principalmente da aparência dos esfregaços do controle de qualidade e da comparação com os espécimes do paciente.

Observações e limitações: Devido às dificuldades em obter a penetração do corante na parede celular dos esporos, as modificações do método do tricrômico apresentam excelentes resultados. As limitações do procedimento estão relacionadas com as amostras: correto tempo e velocidade de centrifugação; filtração através de gaze levemente umedecida com água corrente dobrada duas vezes e dificuldades na identificação dos esporos devido ao seu pequeno tamanho (1 a 2μm). Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

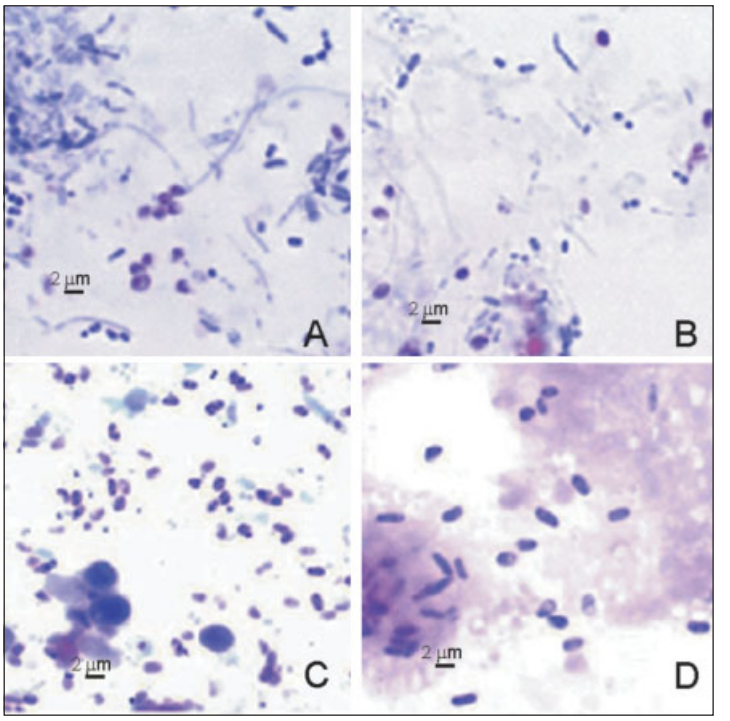


Fig. 11.4 — *Microfotografias de esporos de microsporídios corados pelo Gram-Chromotrope (1.259X). A, B)* Enterocytozoon bieneusi *em esfregaços de fezes humanas; C)* Encephalitozoon intestinalis *em esfregaços de fezes humanas; D)* Encephalitozoon intestinalis *em cultura de células. (Cortesia de Hércules Moura, CDC, EUA.)*

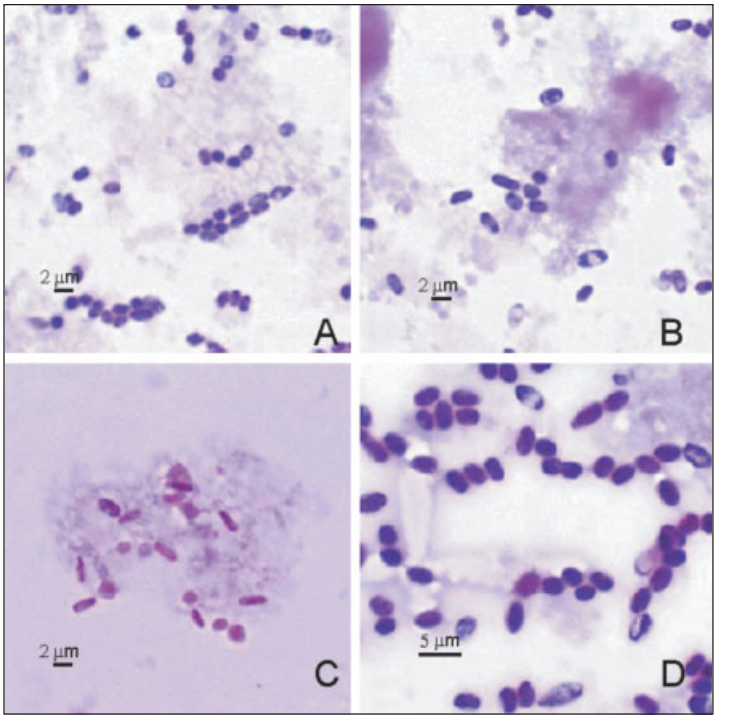


Fig. 11.5 — *Microfotografias de microsporídios obtidos de cultivo celular, corados pelo Gram-Chromotrope (1.259X). A)* Encephalitozoon cuniculi*; B)* Encephalitozoon hellem*; C)* Vittaforma corneae*; D)* Nosema algerae*. (Cortesia de Hércules Moura, CDC, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blanshard C, Hollister WS, Peacock CS et al. Simultaneous infection with two types of intestinal microsporidia in a patient with AIDS. Gut, 33:418-420, 1992.
2. Bryan RT, Cali A, Owen RI et al. Opportunistic pathogens in patients with AIDS. In: T Sun T ed. Progress in Clinical Parasitology. Philadelphia (Pa): Field & Wood, 1-26, v.2, 1991.
3. Bryan RT. Microsporidia. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 2513-2524, 1995.
4. Cali A, Owen R. Microsporidiosis. In: Ballows A ed. Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Principles and Practice. New York: Springer Verlag, 929-950, 1988.
5. Cali A, Kotler DP, Orenstein JM. Septata intestinalis n.g, n.sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS. J Euk Microbiol, 40:101-112, 1993.
6. Collins R. Protozoan parasites of the intestinal tract: A review of coccidia and microsporidia. JAOA, 10:593-598, 1997.
7. Desportes I, Les Charpentier Y, Gakian A et al. Occurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n.sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. J Protozool, 32:250-254, 1985.
8. Garcia LS, Shimizu RY. Diagnostic parasitology: An review of topics. Lab Med, 24:13-18, 1993.
9. Garcia LS, Shimizu RY. Diagnostic parasitology: Parasitic infections and the compromised host. Lab Med, 24:205-215, 1993.
10. Garcia LS, Shimizu RY, Bruckner DA. Detection of microsporidial spores in fecal specimens from patients diagnosed with cryptosporidiosis. J Clin Microbiol, 32:1739-1741, 1994.
11. Garcia LS. Laboratory methods for diagnosis of parasitic infections. In: Baron EJ, Peterson LR, Finelgold SM eds. Bailley & Scott's Diagnostic Microbiology. St. Louis: CV Mosby, 776-861, 1994.
12. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3nd ed Washington (DC): ASM Press, 1997.
13. Hartskeerl RA, Van Gool T, Schuitema AR et al. Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to Encephalitozoon intestinalis. Parasitology, 110:277-285, 1995.
14. Healy GR, Garcia LS. Intestinal and urogenital protozoa. In: Murray PR, Baron MA, Tenover FC, Yolken RH eds. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington (DC): ASM Press, 1204-1228, 1995.
15. Kokoskin E, Gyorkos TW, Camus A et al. Modified technique for efficient detection of microsporidia. J Clin Microbiol, 32:1974-1975, 1994.
16. Leitch GJ, Visvesvara GS, He Q. Inhibition of microsporidian spore germination. Parasitol Today, 9:422-424, 1993.
17. Levine N, Corliss JO, Cox FEG et al. A newly revised classification of the protozoa. J Protozool, 27:37-58, 1980.
18. Moura H, Nunes da Silva JL, Sodré FC et al. Gram-chromotrope: a new technique that enhances detection of microsporidial spores in clinical samples. J Euk Microbiol, 43:954-955, 1996.
19. Moura H, Schwartz DA, Bornay-Llinares F et al. A new and improved "quick-hot Gram-chromotrope technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples, including paraffin-embedded tissue sections. Arch Pathol Lab Med, 211:888-893, 1997.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

20. Orenstein JM, Dieterich T, Kolter DP. Systemic dissemination by a new recognized intestinal microsporidia species in AIDS. AIDS, 6:1143-1150, 1992.

21. Pol S, Romana CA, Richard S et al. Microsporidia infection in patients with the human immunodeficiency virus and unexplained cholangitis. N Engl J Med, 328:95-99, 1993.

22. Ryan NJ, Sutherland G, Coughlan K et al. A new trichrome-blue stain for detection of microsporidial species in urine, stool, and nasopharyngeal specimens. J Clin Microbiol, 31:3264-3269, 1993.

23. Schwartz DA, Bryan RT, Hewan-Lowe KO et al. Dissemination microsporidiosis (*Encephalitozoon hellem*) and acquired immunodeficiency syndrome. Arch Pathol Lab Med, 116:660-668, 1992.

24. Sobottka I, Albrech H, Schottelius J et al. Disseminated *Encephalitozoon* (*Septata*) *intestinalis* infection in a patient with AIDS: novel diagnostic approaches and autopsy-confirmed parasitological cure following with albendazole. J Clin Microbiol, 33:2948-2952, 1995.

25. Terra L, Pellicano S, Milano M. Diagnosi di laboratori delle microparassitosi intestinali in pazienti affeti da AIDS: stato dell'arte. Minerva Med, 89:23-27, 1998.

26. Van Gool T, Canning EU, Dankert J. An improved practical and sensitive technique for the detection of microsporidian spores in stool samples. J Trans R Soc Trop Med Hyg, 88:189, 1994.

27. Visvesvara GS, Leitch GJ, Moura H et al. Culture, electron microscopy, and immunoblot studies on a mocrosporidian parasite isolated from the urine of a patient with AIDS. J Protozool, 38:1055, 1991.

28. Weber R, Bryan RT, Owen RL et al. Enteric opportunistic infections working group. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. N Engl J Med, 326:161-166, 1992.

29. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RI. Human microsporidian infections. Clin Microbiol Ver, 7:426-461, 1994.

30. Ziert CC, Gill VJ, Ziert WS. Detection of microsporidian spores in clinical samples by indirect fluorescent antibody assay using whole-cell antisera to *Encephatlitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon hellen*. J Clin Microbiol, 31:3071, 1993.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte



SEÇÃO 4

Parasitos do Sangue e dos Tecidos

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Capítulo 12



Exame do Sangue

Geraldo Attilio De Carli

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Diferentes estágios de desenvolvimento de várias espécies de parasitos são diagnosticados no sangue periférico humano. Entre estes hemoparasitos estão incluídos protozoários e helmintos. Nesses grupos encontram-se tripanossomos (*Trypanosoma cruzi*), plasmódios (*Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*), babésia (*Babesia bigemina*), *Leishmania donovani* e diversas espécies de filárias (*Wuchereria bancrofti*, *Mansonella ozzardi*, *Onchocerca volvulus*). Os *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*) e a *Babesia* spp. são encontrados parasitando as hemácias; enquanto os tripanossomos e as microfilárias são detectados fora das hemácias, e os estágios amastigotas da *Leishmania* são ocasionalmente encontrados nos monócitos. As microfilárias e os tripanossomos podem ser identificados no sangue periférico, devido a sua forma e motilidade. Entretanto, uma coloração permanente é necessária para estabelecer uma identificação específica final dos organismos. Uma variedade de procedimentos é usada e indicada na preparação e no exame do sangue para a pesquisa dos parasitos. A identificação de todos os parasitos do sangue é realizada por um ou dois tipos de esfregaços sangüíneos: esfregaços estirados ou esfregaços espessos (gota espessa). Esses esfregaços são preparados com sangue total colhido com anticoagulante, ou com o sedimento de diferentes métodos indicados para concentrar tripanossomos e

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

microfilárias no sangue. Os organismos não são identificados tomando como referência, somente, a preparação direta a fresco; esfregaços permanentes corados deverão ser examinados para que seja estabelecida a caracterização morfológica e a identificação específica do organismo em estudo. Uma variedade de corantes e métodos de coloração é indicada para a coloração dos hemoparasitos. Quando os parasitos não forem encontrados na primeira amostra, colher novos espécimes em intervalos de seis a 12 horas, até que um diagnóstico seja estabelecido ou que não haja mais suspeita de infecção (usualmente três a cinco dias). O diagnóstico das infecções pelos parasitos do sangue não deve ser considerado negativo, quando somente uma amostra sangüínea foi examinada[3].

PREPARAÇÃO DOS ESFREGAÇOS SANGÜÍNEOS

Dois tipos de esfregaços sangüíneos são usados: os espessos e os estirados. Entretanto, a combinação de ambos em uma mesma lâmina de microscopia pode oferecer melhores resultados. Essas preparações são indicadas para o estudo e diagnóstico das hemoparasitoses. As lâminas deverão estar quimicamente limpas, para assegurar uniforme preparação dos esfregaços e permitir sua adesão à lâmina. Antes do uso, as lâminas velhas deverão ser lavadas com detergente e depois em álcool etílico a 70%, enquanto as lâminas novas, somente em álcool etílico a 70%[1,3,15,16,19,20].

Esfregaços Estirados

Os esfregaços estirados (Figs. 12.1 e 12.3) são geralmente empregados para o estudo das hemácias, a contagem diferencial dos leucócitos e para o

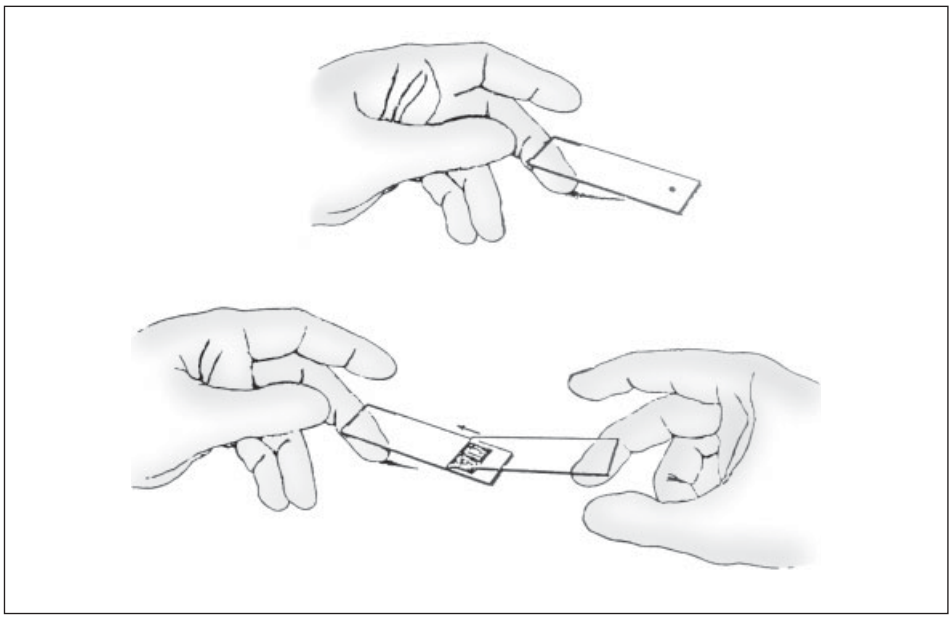


Fig. 12.1 — *Preparação de esfregaço sangüíneo estirado. (Adaptada de Markell EK, Voge M, John DT. Medical Parasitology. 7th ed. Philadelphia (Pa): W.B. Saunders Co., 1992.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

diagnóstico e o estudo diferencial dos distintos estágios das espécies de *Plasmodium*, quando a densidade dos parasitos for alta; entretanto, esses esfregaços não apresentam bons resultados quando a densidade dos parasitos da malária é baixa[1,2,4,15,16,20].

Preparação

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colocar em lâmina de microscopia, perto de uma das extremidades, uma gota de sangue fresco, colhido por punção venosa ou da polpa digital.

3. Com outra lâmina, estirar a gota de sangue da direita para a esquerda, em direção ao lado oposto, deixando, se for necessário, um espaço para a preparação de esfregaço espesso.

4. Fazer um ângulo de 30-45° entre a segunda lâmina e a gota de sangue. Dessa maneira, as células são estendidas separadamente, não sendo sobrepostas ou amontoadas.

5. O esfregaço estirado deverá ter no mínimo 2cm de comprimento, ocupando a área central da lâmina, com as margens livres de ambos os lados (Fig. 12.1).

6. Deixar secar à temperatura ambiente.

7. A necessidade de fixar o esfregaço antes da coloração depende do método de coloração a ser usado.

Observação: Os esfregaços estirados poderão ser preparados com sangue colhido com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)	5g
Água destilada-deionizada	100ml

• Dissolver o anticoagulante em água. Distribuir em alíquotas de 0,4ml e deixar evaporar a água. Esse volume de anticoagulante é suficiente para 10ml de sangue. Na preparação do EDTA poderá ser usado o Na_2EDTA (sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético) ou K_2EDTA (sal dipotássico do ácido etilenodiaminotetracético).

Esfregaços Espessos (Gota Espessa)

Os esfregaços espessos (Figs. 12.2 e 12.3) são preparações sangüíneas que usam quantidades relativamente grandes de sangue em pequena área, a qual é desemoglobinada para oferecer melhores resultados ao exame microscópico[1,2,5,15,16].

Preparação

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Colocar em lâmina de microscopia três a quatro gotas de sangue fresco, colhidas por punção venosa ou da polpa digital.

3. Com a ponta de outra lâmina e com movimentos circulares, contínuos, reunir as gotas, criando uma área de aproximadamente 2cm de diâmetro (Fig. 12.2); continuar com os movimentos circulares, do centro para a periferia, durante 30 segundos, para evitar a formação de fibrina, a qual poderá obscurecer as preparações coradas.

4. Terminar os movimentos circulares no centro do círculo de sangue; por meio desse procedimento o esfregaço apresenta a borda fina e o centro espesso.

5. Deixar secar à temperatura ambiente e, após, mergulhar a preparação em água corrente ou em solução salina a 0,85%, para que se produza a hemólise. Secar à temperatura ambiente.

Controle de Qualidade (CQ)

1. O esfregaço estirado deverá ter no mínimo 2cm de comprimento, ocupando a área central da lâmina e com as margens livres de ambos os lados.

2. O esfregaço espesso deverá ser de arredondado a oval com aproximadamente 2cm de área, ocupando obliquamente uma extremidade da lâmina.

3. O esfregaço não deve apresentar áreas claras ou manchas (indicativo de gordura ou impressão digital na lâmina de microscopia).

4. Excesso de corante no esfregaço poderá confundir e tornar difícil a identificação do organismo (Fig. 12.3).

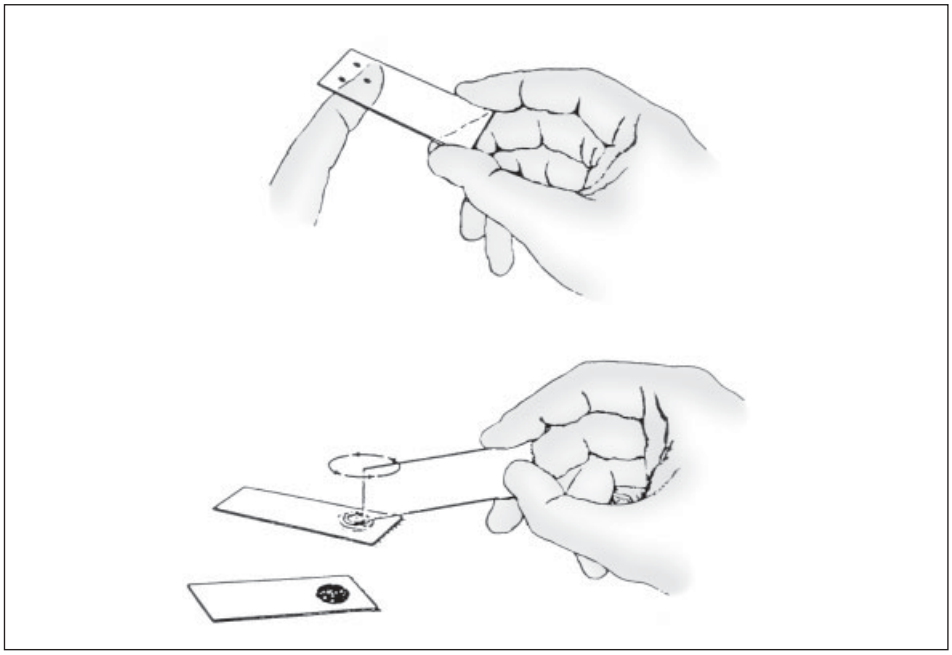


Fig. 12.2 — *Preparação de esfregaço sangüíneo espesso. (Adaptada de Markell EK, Voge M, John DT. Medical Parasitology. 7th ed. Philadelphia (Pa): W.B. Saunders Co., 1992.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

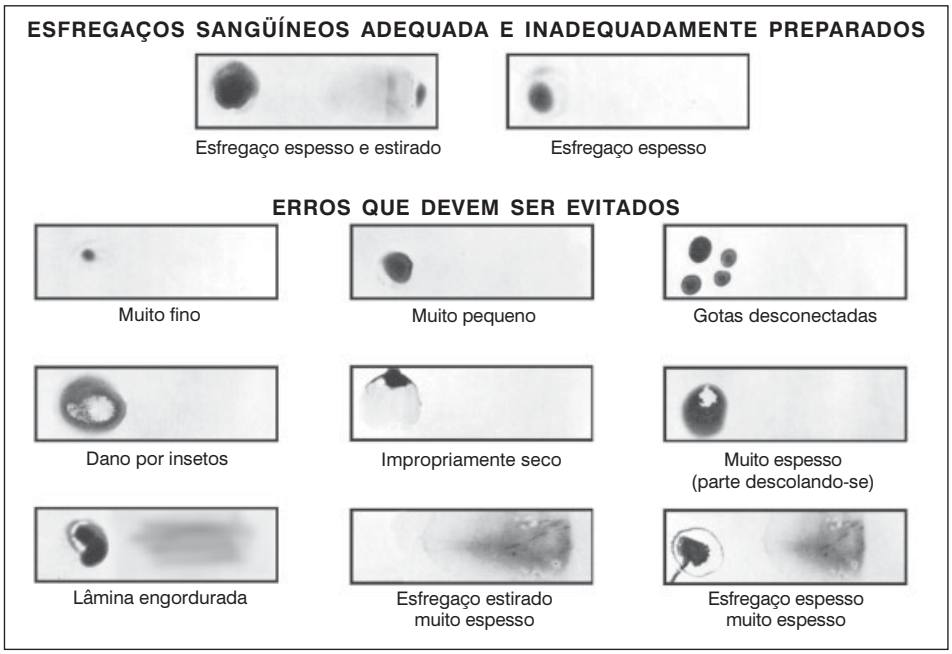


Fig. 12.3 — *Esfregaços sangüíneos adequada e inadequadamente preparados. (Adaptada e reproduzida de Laboratory Diagnosis of Parasitic Diseases, Emory Medical School Course and Laboratory Training Unit Laboratory Consultation and Developed Branch, CDC, Atlanta Georgia, EUA, 1966.)*

Observações

1. No estudo e diagnóstico da malária, por meio de esfregaços espessos, o número das hemácias aumenta extraordinariamente em um único campo microscópico; a eficiência na observação dos parasitos é ampliada de três a 22 vezes, mas depende da espessura do esfregaço, da densidade dos parasitos e da exatidão da pesquisa realizada pelo técnico.

2. Outros líquidos são indicados para a produção de hemólise: solução isotônica de azul-de-metileno; solução de saponina a 0,2-0,5%, solução tampão, pH 7,0-7,2 e água destilada, tamponada, pH 7,0-7,2.

3. Infecções leves podem ser omitidas no exame dos esfregaços estirados; entretanto, o aumento do volume do sangue presente nos esfregaços espessos permite detectar a infecção, mesmo com parasitemias leves.

4. A morfologia dos parasitos e dos eritrócitos pode se tornar atípica quando o sangue é colhido com anticoagulante e quando os esfregaços são preparados uma hora após a colheita.

Combinação de Esfregaços Estirados e Espessos

Em inquéritos epidemiológicos é recomendada a preparação de lâminas com esfregaços espessos e estirados.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

COLORAÇÃO DOS ESFREGAÇOS SANGÜÍNEOS

Uma variedade de corantes e métodos de coloração é indicada para a coloração e identificação dos hemoparasitos. Alguns procedimentos apresentam o fixador combinado com o corante (coloração de Wright); em outros, a fixação é realizada antes da coloração (coloração de Giemsa). Os métodos de coloração mais difundidos são os de: Leishman, Wright, Field, Giemsa, JSB, Walker e Shute.

Coloração de Giemsa

A coloração de Giemsa é usada para diferenciar a morfologia nuclear e/ou citoplasmática de plaquetas, eritrócitos, leucócitos e de parasitos. Esse método é indicado para a coloração de esfregaços estirados, que são fixados com álcool metílico e para esfregaços espessos, que não requerem fixação, pois a lise das hemácias é necessária para que a observação seja realizada. A diluição da solução concentrada de Giemsa, para o uso em solução tampão de fosfato, pH 7,2 ou 6,6-7,2, depende do método específico usado. A solução estoque, apesar de sua estabilidade, deve ser protegida contra a umidade, porque a reação de coloração é oxidativa. Por essa razão, o oxigênio da água inicia a reação destruindo o corante. A solução aquosa para o uso tem validade de um dia. A adição do detergente não-iônico de superfície Triton X-100 em tampão fosfato ao corante de Giemsa, nas quantidades de 0,1% para esfregaços espessos e 0,01% para esfregaços estirados ou para a combinação de esfregaços estirados e espessos, facilita a observação das características morfológicas dos hematozoários, como as granulações de Maurer (*P. falciparum*) e de Schüffner (*P. vivax*)[1,6,15,16,20].

Reagentes

1. Giemsa pó (Azur B) (CI 52010)($C_{15}H_{16}N_3SCl$)
2. Álcool metílico (CH_4O), livre de acetona
3. Glicerina ($C_3H_8O_3$)
4. Diidrogenofosfato de potássio anidro (KH_2PO_4)
5. Hidrogenofosfato dissódico diidratado ($Na_2HPO_4.2H_2O$)
6. Hidrogenofosfato dissódico anidro (Na_2HPO_4)
7. Diidrogenofosfato de sódio monoidratado ($NaH_2PO_4.H_2O$)
8. Triton X-100 (Rohm & Haas)

Preparação do Corante

1. Solução Concentrada de Giemsa

Giemsa, pó (Azur B)	0,6g

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Glicerina	50ml
Álcool metílico	50ml

• Misturar, em um gral, o Giemsa pó e a glicerina. Aquecer em banho de água a 60°C durante duas horas. Deixar esfriar e adicionar o álcool metílico absoluto. Armazenar a solução em um frasco âmbar por duas a quatro semanas. Filtrar em papel-filtro antes de usar.

2. Solução Tampão de Fosfatos, pH 7,2

Diidrogenofosfato de potássio anidro	0,49g
Hidrogenofosfato dissódico diidratado	1,09g
Água destilada-deionizada, q.s.p.	1.000ml

• Dissolver KH_2PO_4 e $Na_2HPO_4.2H_2O$ em água e misturar bem.
Ou

3. Soluções Tampão de Fosfatos (para a preparação de soluções tampão)

a. Solução tampão alcalina, 0,067M

Hidrogenofosfato dissódico anidro	9,5g
Água destilada-deionizada q.s.p.	1.000ml

• Dissolver Na_2HPO_4 em água e misturar bem. Armazenar a solução tampão em frasco de vidro com tampa esmerilhada. Validade da solução: 24 meses.

b. Solução tampão ácida, 0,067M

Diidrogenofosfato de sódio monoidratado	9,2g
Água destilada-deionizada q.s.p.	1.000ml

• Dissolver $NaH_2PO_4.H_2O$ em água e misturar bem. Armazenar a solução tampão em frasco de vidro com tampa esmerilhada. Validade da solução: 24 meses.

c. Solução tampão pH 7,0 a 7,2 (para diluir corante e lavar esfregaços)

Solução tampão alcalina	61ml
Solução tampão ácida	39ml
Água destilada-deionizada	900ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

• Misturar a solução tampão alcalina e a solução tampão ácida. Desprezar a solução tampão quando o pH não estiver entre 7,0 e 7,2. Armazenar a solução tampão em frasco de vidro com tampa esmerilhada.

d. Solução tampão pH 6,8 (para diluir corante e lavar esfregaços)

Solução tampão alcalina	50ml
Solução tampão ácida	50ml
Água destilada-deionizada	900ml

• Misturar a solução tampão alcalina e a solução tampão ácida. Desprezar a solução tampão quando o pH estiver fora de 6,8 ± 0,1. Armazenar a solução tampão em frasco de vidro com tampa esmerilhada.

4. Corante: Solução de Giemsa a 5% em Tampão de Fosfatos, pH 7,2

Giemsa (concentrado)	5ml
Solução tampão de fosfatos pH 7,2	95ml

• Preparar a solução corante em proveta de 100ml. Essa solução de trabalho deverá ser preparada diariamente.

5. Solução Estoque de Triton X-100 a 10% (v/v)

Triton X-100	10ml
Água destilada-deionizada	90ml

6. Solução Triton Tamponada a 0,01% (v/v) e 0,1% (v/v)

Solução aquosa estoque de Triton X-100 a 10%	1ml	10ml
Solução tampão de fosfatos, pH 7,2	1.000ml	1.000ml

Coloração

A fixação e a coloração são usualmente realizadas na cuba de *Coplin*. A solução corante de Giemsa deve ser preparada fresca diariamente.

Usar luvas durante todas as etapas da coloração.

1. Esfregaços Estirados

a. Fixar os esfregaços com álcool metílico durante cinco minutos.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

b. Corar os esfregaços durante 45 minutos com a solução de Giemsa a 5% em tampão de fosfatos pH 7,2.

c. Lavar os esfregaços com água corrente. Deixar secar à temperatura ambiente na posição vertical.

2. Esfregaços Espessos

a. Não fixar os esfregaços.

b. Corar os esfregaços durante 45 minutos com a solução de Giemsa a 5% em tampão de fosfatos pH 7,2.

c. Lavar os esfregaços com água corrente. Deixar secar à temperatura ambiente na posição vertical.

3. Combinação de Esfregaços Espessos e Estirados

a. Fixar somente os esfregaços estirados com álcool metílico durante cinco minutos.

b. Corar ambos os esfregaços, simultaneamente, durante 45 minutos com a solução de Giemsa a 5% em tampão de fosfatos pH 7,2.

c. Lavar os esfregaços com água corrente. Deixar secar à temperatura ambiente na posição vertical.

Controle de Qualidade (CQ)

1. As soluções tampão de fosfatos e a água tamponada devem ser claras sem contaminação visível.

2. Antes do uso, conferir a solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato, pH 7,2, incluindo o tampão de fosfatos e água tamponada.

3. Preparar e corar esfregaços de sangue humano normal e avaliar microscopicamente as reações de coloração das plaquetas, eritrócitos e leucócitos:

a. macroscopicamente, os esfregaços de sangue apresentam a coloração purpúrea. Quando estão azuis, a água tamponada está muito alcalina; quando apresentam cor de rosa ao vermelho a água tamponada está muito ácida;

b. microscopicamente, os eritrócitos coram-se em rosa-pálido, as plaquetas em rosa forte e o núcleo dos leucócitos em púrpura-azul, com citoplasma mais claro; os grânulos eosinofílicos, em brilhante púrpura-vermelho e os grânulos dos neutrófilos, em púrpura. As granulações basófilas não-infectadas dentro dos eritrócitos coram-se em azul.

4. Calibrar o microscópio a cada 12 meses; as objetivas e as oculares usadas na calibração devem ser usadas em todas as medidas realizadas com o microscópio. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

5. Os resultados do controle de qualidade devem ser apropriadamente registrados.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Observações

1. Os esfregaços preparados com sangue venoso colhido com anticoagulante devem ser processados dentro de uma hora. Caso contrário, as características morfológicas dos parasitos e dos eritrócitos podem apresentar estruturas atípicas.

2. Com freqüência os esfregaços espessos desprendem-se das lâminas durante o processo de coloração. O correto pH da água tamponada, das soluções tampão de fosfato e da solução de Giemsa a 5% em tampão de fosfatos, propicia uma correta coloração. As soluções e os corantes com pH incorreto impedem que certas características morfológicas nos esfregaços corados tornem-se visíveis, obstruindo as colorações típicas do núcleo e do citoplasma.

3. Os esfregaços para o controle de qualidade deverão ser corados junto aos esfregaços preparados para o diagnóstico.

4. Quando vários espécimes de pacientes são corados no mesmo dia (usando os mesmos reagentes), é necessário corar e examinar somente um esfregaço para o controle de qualidade.

5. A infecção parasitária não deve ser descartada ou negativada, tomando como referência o estudo e o exame de somente alguns esfregaços permanentes corados.

6. O procedimento aconselhável é colher amostras de sangue em intervalos de seis a 12 horas até que um diagnóstico seja estabelecido em um intervalo de três a cinco dias.

7. Após o exame de, no mínimo, 300 campos com objetiva de imersão (100X), o resultado da pesquisa de parasitos poderá ser considerado negativo.

8. Dependendo da experiência do microscopista, o exame satisfatório de esfregaços espessos requer cinco a 10 minutos (aproximadamente 100 campos) e 15 a 20 minutos para esfregaços estirados (aproximadamente 200 a 300 campos) com aumento de 1.000X (com óleo de imersão).

9. Examinar todo o esfregaço, com objetiva de imersão (100X), para pesquisa de microfilárias.

Coloração de Field

Esse método foi desenvolvido por Field para a coloração de esfregaços espessos no diagnóstico da malária. De modo idêntico à coloração de Giemsa, os esfregaços espessos não são fixados, mas deverão estar secos e sempre preparados com sangue fresco. Duas soluções (A e B) são usadas, ambas isotônicas ou em pH 6,6[12,13].

Reagentes

1. Azul-de-metileno (CI 52015) ($C_{16}H_{18}ClN_3S.3H_2O$).
2. Azur B (CI 52010) ($C_{15}H_{16}N_3SCl$)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

3. Eosina B (CI 45400) ($C_{20}H_6N_2O_9Br_2Na_2$)
4. Hidrogenofosfato dissódico anidro (Na_2HPO_4)
5. Diidrogenofosfato de potássio anidro (KH_2PO_4)

Preparação dos Corantes

1. Solução A

Azul-de-metileno	0,80g
Azur B	0,50g
Hidrogenofosfato dissódico anidro	5g
Diidrogenofosfato de potássio anidro	6,25g
Água destilada-deionizada	500ml

• Dissolver os sais fosfatos em água e adicionar os corantes. Deixar a solução em repouso durante 24 horas. Filtrar em papel-filtro antes do uso.

2. Solução B

Eosina B	1g
Hidrogenofosfato dissódico anidro	5g
Diidrogenofosfato de potássio anidro	6,25g
Água destilada-deionizada	500ml

• Dissolver os sais fosfatos em água e adicionar o corante. Deixar a solução em repouso durante 24 horas. Filtrar em papel-filtro antes de usar.

Coloração

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
2. Mergulhar os esfregaços por 1-5 segundos na solução A.
3. Lavar os esfregaços com água destilada-deionizada, até que o corante cesse de escorrer da lâmina.
4. Mergulhar os esfregaços por 1-5 segundos na solução B.
5. Lavar os esfregaços com água destilada-deionizada por 2-3 segundos e secar à temperatura ambiente na posição vertical.

Observação: A coloração é usualmente realizada na cuba de *Coplin*.

Coloração de Leishman

Esse método de coloração é indicado para a coloração de esfregaços estirados[18].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Reagentes

1. Eosina-azul-de-metileno, segundo Leishman (Merck cat. n.º 1.350)
2. Álcool metílico (CH_4O)
3. Tampão de fosfatos pH 6,8-7,2 (ver p. 298)

Preparação do Corante

Eosina-azul-de-metileno, segundo Leishman	0,15g
Álcool metílico	100ml

• Em capela de exaustão, dissolver o corante no álcool metílico, previamente aquecido a 40°C. Deixar em repouso durante cinco dias. Filtrar em papel-filtro antes do uso.

Coloração

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
2. Cobrir os esfregaços durante 30-60 segundos com 0,5ml da solução metanólica saturada de Leishman.
3. Dissolver o corante com igual volume de tampão de fosfatos, pH 7,0-7,2 (1ml) e deixar corar por cinco minutos.
4. Lavar os esfregaços com tampão de fosfatos (pH 7,0-7,2) e deixar secar à temperatura ambiente na posição vertical.

Coloração de Wright

O corante de Wright é usado na coloração de esfregaços estirados de sangue para a detecção de parasitos do sangue; entretanto, esse procedimento é inferior ao método de Giemsa para a coloração de esfregaços espessos. Sendo a reação de coloração semelhante ao método de Giemsa, no procedimento é usado água tamponada com pH 6,8. Os esfregaços não necessitam ser fixados, desde que a fórmula do corante possua álcool metílico. Alguns autores recomendam que na coloração de esfregaços estirados o corante não deve ser diluído, enquanto na de esfregaços espessos o corante pode ser diluído, com tampão de fosfatos (pH 7,0-7,2), na proporção de 1:30 (v/v)[7,21].

Reagentes

1. Eosina-azul-de-metileno, segundo Wright (Merck cat. n.º 9.278)
2. Glicerina ($C_3H_8O_3$)
3. Álcool metílico (CH_4O)
4. Solução tampão de fosfatos pH 6,8 (ver p. 298)
5. Solução tampão alcalina, 0,067M (ver p. 297)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

6. Solução tampão ácida, 0,067M (ver p. 297)
7. Solução tampão de fosfatos pH 7,2 (ver p. 297)

Preparação do Corante

Eosina-azul-de-metileno, segundo Wright	0,24g
Glicerina	3ml
Álcool metílico	97ml
ou	
Eosina-azul-de-metileno, segundo Wright	0,9g
Álcool metílico	500ml

• Dissolver o corante em gral pela adição de pequenas quantidades de álcool metílico até completar o volume de 500ml. Filtrar em papel-fitro antes do uso. Validade: 36 meses.

Coloração

Usar luvas durante todas as etapas da coloração.

Esfregaço Estirado

1. Cobrir o esfregaço durante 1-3 minutos com 1ml do corante (o tempo ótimo de coloração varia com cada bateria de corante).

2. Dissolver o corante com igual volume de água tamponada, pH 6,8 (1ml) e deixar corar por 2-4 minutos (formar-se-á, na superfície do líquido, uma película de brilho metálico).

3. Lavar o esfregaço com água tamponada, pH 6,8. Deixar secar à temperatura ambiente na posição vertical.

Combinação entre Esfregaço Estirado e Espesso

1. Mergulhar o esfregaço espesso em água tamponada, pH 6,8, durante 10 minutos para que se produza a hemólise dos eritrócitos (o esfregaço pode também ser mergulhado em água destilada). Cuidar para que a água tamponada não toque o esfregaço estirado não fixado.

2. Cobrir o esfregaço estirado e o espesso durante 1-3 minutos com 1ml do corante.

3. Dissolver o corante com igual volume de água tamponada, pH 6,8 (1ml) e deixar corar por 2-4 minutos (formar-se-á, na superfície do líquido, uma película de brilho metálico).

4. Lavar o esfregaço com água tamponada, pH 6,8, e deixar secar à temperatura ambiente na posição vertical.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Controle de Qualidade (CQ): Colorações

1. As soluções tampão de fosfatos e a água tamponada devem ser claras sem contaminação visível.

2. Antes do uso, conferir a solução de Wright em tampão fosfato, pH 6,8, incluindo o tampão de fosfatos e a água tamponada.

3. Preparar e corar esfregaços sangüíneos nornais de sangue humano e, microscopicamente, avaliar as reações de coloração das plaquetas, eritrócitos e leucócitos:

a. macroscopicamente, os esfregaços de sangue apresentam a coloração purpúrea. Quando estão azuis, a água tamponada está muito alcalina; quando apresentam cor de rosa ao vermelho a água tamponada está muito ácida;

b. microscopicamente, os eritrócitos coram-se em rosa-pálido, as plaquetas, em rosa forte e o núcleo dos leucócitos, em púrpura-azul, com citoplasma mais claro; os grânulos eosinofílicos, em púrpura-vermelho brilhante e os grânulos dos neutrófilos, em púrpura. As granulações dos basófilos variam do azul-escuro ao preto.

4. Discretas variações podem ocorrer nas colorações descritas anteriormente, as quais dependem da partida do corante usado e das características do sangue, mas se as várias estruturas morfológicas forem distintas, a coloração é considerada satisfatória.

5. Calibrar o microscópio a cada 12 meses; as objetivas e as oculares usadas na calibração devem ser usadas em todas as medidas realizadas com o microscópio. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

6. Os resultados do controle de qualidade devem ser apropriadamente registrados.

Observações

1. Os esfregaços preparados com sangue venoso colhido com anticoagulante devem ser processados dentro de uma hora. Caso contrário, as características morfológicas dos parasitos e dos eritrócitos podem apresentar estruturas atípicas.

2. Com freqüência os esfregaços espessos desprendem-se das lâminas durante o processo de coloração. O correto pH da água tamponada, das soluções tampão de fosfato e da solução de Giemsa a 5% em tampão de fosfatos propicia uma correta coloração. As soluções e corantes com pH incorreto impedem que certas características morfológicas nos esfregaços corados tornem-se visíveis, obstruindo as colorações típicas do núcleo e do citoplasma.

3. Os esfregaços para o controle de qualidade deverão ser corados junto aos esfregaços preparados para o diagnóstico. Quando vários espécimes de pacientes são corados no mesmo dia (usando os mesmos reagentes), é necessário corar e examinar somente um esfregaço para o controle de qualidade.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

4. A infecção parasitária não deve ser descartada ou negativada, tomando como referência o estudo e o exame de somente alguns esfregaços permanentes corados. O procedimento aconselhável é colher amostras de sangue em intervalos de seis a 12 horas até que um diagnóstico seja estabelecido em um intervalo de três a cinco dias.

5. Somente após o exame de, no mínimo, 300 campos (1.000X), com objetiva de imersão, o resultado da pesquisa de parasitos poderá ser considerado negativo.

6. Dependendo da experiência do microscopista, o exame satisfatório de esfregaços espessos requer de cinco a 10 minutos (aproximadamente 100 campos) e de 15 a 20 minutos para esfregaços estirados (aproximadamente 200 a 300 campos) com aumento de 1.000X (com óleo de imersão).

7. Examinar todo o esfregaço, com aumento de 100X, para pesquisa de microfilárias[6,7].

Controle de Qualidade (CQ): Coloração dos Esfregaços Sangüíneos

1. Nos esfregaços estirados, corados pelo método de Giemsa, as formas amastigotas da *L. donovani* são encontradas dentro dos monócitos. O material nuclear cora-se de vermelho-púrpura escuro, o citoplasma em azul-claro e o cinetoplasto, quando presente, em azulado-purpúreo.

2. As formas tripomastigotas, com localização extracelular (móveis no exame direto a fresco) e coradas pelo método de Giemsa, apresentam reações de coloração semelhantes a da *L. donovani*, mostrando um visível cinetoplasto.

3. As microfilárias podem ser encontradas no exame direto a fresco. Quando coradas pelo método de Giemsa, mostram a célula excretora e a embrionária em azul-celeste, a célula R, o poro excretor e o anal em rosa-avermelhado e a bainha, quando presente, em rosa-claro. Pela hematoxilina de Delafield os núcleos caudais coram-se em azul ou púrpura; a bainha, quando presente, em púrpura-claro; e o citoplasma, em avermelhado. As células excretora e embrionária quando visíveis, não diferem em coloração dos núcleos. O corpo central é visto como uma estrutura esbranquiçada[6,7].

CONCENTRAÇÃO DO SANGUE

Os procedimentos de concentração aumentam o número de organismos recuperados nas amostras sangüíneas, ampliando a sensibilidade do exame. Esses métodos desenvolvidos para o isolamento e concentração de tripanossomos, leishmânias e microfilárias devem ser realizados rotineiramente com todas as amostras sangüíneas enviadas ao laboratório. Os procedimentos de concentração do sangue são indicados para a pesquisa de hemoparasitos quando: a) os organismos suspeitos não são identificados nos esfregaços espessos e b) a taxa do parasitismo, sendo muito baixa, dificulta a identificação das espécies. Pode-se conseguir maior concentração dos parasitos por diferentes processos: a) centrifugação do sangue (creme leucocitário); b) método da centrifugação tríplice; c) técnica das fito-hemaglutininas; d)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

centrifugação do micro-hematócrito; e) técnica da diferença de gravidade; f) técnica de Knott; g) método da membrana filtrante e h) técnica alternativa da membrana filtrante. Por vezes, é necessário repetir a pesquisa em vários dias e várias vezes ao dia, até que se positive a presença do parasito.

Centrifugação do Sangue (Creme Leucocitário)

A concentração do sangue pela centrifugação é o mais simples procedimento para a pesquisa de parasitos no creme leucocitário. Esse método é empregado para a detecção da *Leishmania donovani*, de tripanossomos e de microfilárias no sangue periférico[8].

Amostra

Sangue total colhido com anticoagulante (EDTA, heparina e/ou citrato de sódio).

Reagentes

1. Solução salina de citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) a 5% (m/v), heparina ou EDTA.
2. Corante de Giemsa (ver p. 296)
3. Álcool metílico (CH_4O), livre de acetona

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colher 9ml de sangue venoso e transferir diretamente para tubo de centrífuga contendo 1ml de citrato de sódio a 5%. Misturar. Tampar o tubo e centrifugar (100 x *g* por 15 minutos).

3. Com pipeta capilar, remover o creme leucocitário, sedimentado entre os eritrócitos e o plasma, ou transferir o creme leucocitário e o plasma para outro tubo e centrifugar (300 x *g* por 15 minutos).

4. Realizar exame microscópico direto do creme leucocitário para a observação de formas tripomastigotas ativamente móveis e de microfilárias:

a. colocar uma gota de solução salina a 0,85% em uma lâmina de microscopia;

b. remover uma gota do sedimento (creme leucocitário) e misturá-la na salina, cobrindo a preparação com uma lamínula;

c. examinar a presença de organismos móveis com pequeno aumento (10X) e grande aumento (40X).

5. Preparar esfregaços estirados, deixar secar à temperatura ambiente, fixar e corar pelo método de Giemsa e/ou pela hematoxilina de Delafield.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Controle de Qualidade (CQ)

1. Verificar a calibração da centrífuga.

2. Preparar e corar esfregaços sangüíneos normais de sangue humano e, microscopicamente, avaliar as reações de coloração das plaquetas, eritrócitos e leucócitos. Quando presentes, os parasitos apresentam colorações características.

3. Calibrar o microscópio a cada 12 meses; as objetivas e as oculares usadas na calibração devem ser usadas em todas as medidas realizadas com o microscópio. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

4. Os resultados do controle de qualidade devem ser apropriadamente registrados.

Método da Centrifugação Tríplice

Essa técnica é indicada para detectar a presença de tripanossomos no sangue periférico, especialmente quando o nível da parasitemia é muito baixo. Nesse procedimento as hemácias podem ser previamente removidas por uma ou duas centrifugações em baixa velocidade. O sedimento do plasma sobrenadante é centrifugado e examinado[10,11,15].

Amostra

Sangue total coletado com anticoagulante (EDTA, heparina ou citrato de sódio).

Reagentes

1. Solução salina de citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) a 5% (m/v), heparina ou EDTA
2. Corante de Giemsa (ver p. 296)
3. Álcool metílico (CH_4O), livre de acetona
4. Corante de Wright (ver p. 302)

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colher 9ml de sangue venoso e transferir diretamente para tubo de centrífuga contendo 1ml de citrato de sódio a 5%. Misturar.

3. Centrifugar (100 x *g* por 15 minutos).

4. Colher o líquido sobrenadante e transferir diretamente para outro tubo de centrífuga e centrifugar a 250 x *g* por 10 minutos.

5. Transferir, outra vez, o líquido sobrenadante para outro tubo de centrífuga e centrifugar a 700 x *g* por 10 minutos.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

6. Decantar o líquido sobrenadante e examinar diretamente a metade do sedimento através do exame direto a fresco para a presença de tripomastigotas ativamente móveis. Com o sedimento remanescente, preparar esfregaços estirados corados pelos métodos de Giemsa ou de Wright.

Controle de Qualidade (CQ)

1. Verificar a calibração da centrífuga.
2. Quando possível, controlar o procedimento usando sangue positivo contendo tripanossomos. Na impossibilidade da obtenção de sangue positivo, seguir o método testando a amostra enviada ao laboratório para diagnóstico.
3. Calibrar o microscópio a cada 12 meses; as objetivas e as oculares usadas na calibração devem ser usadas em todas as medidas realizadas com o microscópio. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.
4. Os resultados do controle de qualidade devem ser apropriadamente registrados.

Observação

1. Existem outros métodos que removem as hemácias e permitem melhor visualização dos parasitos.
2. Strout deixa o sangue coagular e retrair o coágulo, para então obter soro. Em seguida, retira os glóbulos residuais pela centrifugação lenta (160 x *g* por 3 minutos)[11]. Ver Capítulo 13 — *Trypanosoma (S) cruzi*.

Técnica das Fito-Hemaglutininas

Esse método tem sido empregado com sucesso para o isolamento de tripanossomos (*T. cruzi*, *T.* (*b*) *gambiense*), principalmente quando o nível de parasitismo é muito baixo[11].

Amostra

Sangue total coletado com anticoagulante (EDTA, heparina ou citrato de sódio)

Reagentes

1. Solução salina de citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) a 5% (m/v), heparina.
2. Fito-hemaglutinina P (*Bacto Phytohemagglutinin P*) (Difco n.° 3110-56-4).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Método

1. Reidratar a fito-hemaglutinina P. Ver orientação do fabricante.

2. Colher 9ml de sangue venoso e transferir diretamente para tubo de centrífuga contendo gotas de heparina ou 1ml de citrato de sódio a 5%. Misturar.

3. Adicionar fito-hemaglutinina ao sangue heparinizado ou citratado na concentração (0,1mg/1ml).

4. Agitar cuidadosamente o sangue durante cinco segundos e deixar em repouso a mistura durante cinco minutos, à temperatura ambiente.

5. Centrifugar lentamente (150 x *g* por 10 minutos). Os glóbulos aglutinados sedimentam pela centrifugação em baixa velocidade.

6. Decantar o líquido sobrenadante e examinar o sedimento por meio do exame direto a fresco para a presença de tripomastigotas ativamente móveis.

Controle de Qualidade (CQ)

1. Verificar a calibração da centrífuga.

2. Quando possível, controlar o procedimento usando sangue positivo contendo tripanossomos. Na impossibilidade da obtenção de sangue positivo, seguir o método testando a amostra enviada ao laboratório para diagnóstico.

3. Calibrar o microscópio a cada 12 meses; as objetivas e as oculares usadas na calibração devem ser usadas em todas as medidas realizadas com o microscópio. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

4. Os resultados do controle de qualidade devem ser apropriadamente registrados.

Observação: Segundo Yaeger[22] há recuperação de 50% a 60% das formas tripomastigotas presentes que mostram morfologia e infectividade preservada.

Centrifugação do Micro-Hematócrito

A utilização de tubos capilares (micro-hematócrito) é indicada para o diagnóstico rápido da tripanossomíase e da malária, principalmente quando o nível de parasitemia é muito baixo[11].

Procedimento de Feilij

Coletar 50ml de sangue digital em seis tubos de micro-hematócrito. Fechar cada tubo. Centrifugar o sangue em centrífuga de micro-hematócrito (700 x *g* por 40 segundos). Cortar os tubos entre o creme leucocitário e a película de eritrócitos. Colocar o creme leucocitário em uma lâmina de

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

microscopia, cobrindo a preparação com lamínula. Observar a presença de tripanossomos ativamente móveis com aumento de 400X[14].

Procedimento de La Fuente

Coletar 75µl de sangue digital em um ou mais tubos de micro-hematócrito heparinizado. Fechar os tubos. Centrifugar (1.500 x *g* por 7 minutos). Fixar o tubo capilar em uma lâmina e examinar com objetiva de imersão, aumento de 400X, a presença de tripanossomos ativamente móveis[17].

Método da Centrifugação do Micro-Hematócrito QBC®

O método do tubo capilar (QBC® *Capillary Blood Tube*, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) é indicado para a pesquisa de *Plasmodium* spp., sendo também usado com sucesso na pesquisa de tripanossomos, principalmente quando o nível de parasitemia é muito baixo[13,15]. Ver Capítulo 15 — *Plasmodium* spp.

Técnica da Diferença de Gravidade

Outro método de concentração é separar os parasitos das hemácias por diferença de densidade.

Método de Rohwedder

Adicionar silicone líquido, de densidade 1.075g/ml ao sangue colhido com anticoagulante. Por centrifugação, as hemácias sedimentam e os parasitos e os leucócitos ficam acima do silicone[11].

Método de Budzko e Kierszenbaum

Adicionar a mistura Ficoll-Hypaque de densidade 1.077g/ml, ou seja, solução com 9,6% de N-metil 3,5-diacetamida-2,4,6 triiodobenzoato de sódio e 5,6% de Ficoll. Os autores referem-se à recuperação de 95% a 100% de tripomastigotas a partir de sangue contendo 9,5 x 10^x a 18,4 x 10^6 parasitos por milímetro[11].

Método da Membrana Filtrante

O método da membrana filtrante foi desenvolvido para a recuperação de microfilárias em pacientes com infecções baixas. Quando for necessário, grandes quantidades de sangue (20ml ou mais) podem ser usadas nesse método, o que representa uma vantagem sobre os procedimentos de centrifugação simples. As microfilárias são concentradas e recuperadas na

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

membrana úmida, quando estiverem presentes na amostra[9]. Ver capítulo 19 — Diagnóstico Laboratorial da Filariose Bancroftiana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ash LR, Oriehl TC. Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. Chicago (Ill): ASCP Press, 1991.
2. Ash LR, Oriehl TC. Atlas of Human Parasitology. 4th ed Chicago (Ill): ASCP Press, 1997.
3. Bullock-Iacullo S. Detection of blood parasites. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, p. 7.8.1.1-7.8.1.3. v.2, 1992.
4. Bullock-Iacullo S. Preparation of thin blood films. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, p.7.8.2.1-7.8.2.2. v.2, 1992.
5. Bullock-Iacullo S. Preparation of thick blood films. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, p.7.8.1-7.8.3.3. v.2, 1992.
6. Bullock-Iacullo S. Giemsa Stain. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, p.7.8.4.1-7.8.4.6. v.2, 1992.
7. Bullock-Iacullo S. Wright's Stain. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, p.7.8.5.1-7.8.5.4. v.2, 1992.
8. Bullock-Iacullo S. Concentration procedures: Buffy Coat Concentration. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, p.7.8.7.1-7.8.7.3. v.2, 1992.
9. Bullock-Iacullo S. Concentration procedures: Membrane Filtration Concentration. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, p.7.8.8.1-7.8.8.3. v.2, 1992.
10. Bullock-Iacullo S. Concentration triple centrifugation concentration. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, p.7.8.10.1-7.8.10.3. v.2, 1992.
11. Camargo M. Diagnóstico de laboratório. In: Zigman B, Andrade A, eds. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.175-198, 1979.
12. Field JW. A simple method of preserving the outlines of leucocytes and material parasites in giemsa-stained thick blood films. Trans R Soc Trop Med Hyg 33:635-638, 1940.
13. Field JW. Turther note on a method of staining malarial parasites in thick blood films. Trans R Soc Trop Med Hyg 35:35-42, 1941.
14. Feilij H, Muller L, Gonzalez-Cappa SM. Direct mocromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas's disease. J Clin Microbiol 18:327-330, 1983.
15. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3nd ed. Washington (DC): ASM Press, 1997.
16. Garcia LS. Practical Guide to Diagnostic Parasitology. Washington (DC): ASM Press, 1999.
17. La Fuente C, Saucedo E, Urjel R. The use of microhaematocrit tubes for the rapid diagnosis of Chagas's disease and malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 78:278-279, 1984.
18. Leishman WB. The application of Romanowsky stain in malaria. Brit Med J 1:635, 1901.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

19. Markell EK, Voge M, John DT. Medical Parasitology. 7th ed. Philadelphia (Pa): W.B. Saunders Co., 1992.

20. Melvin DM, Brooke MM. Triton X-100 in Giemsa staining of blood parasites. Stain Tech 30:269-275, 1955.

21. Wright JH. A rapid method for the differential staining of blood films and malarial parasites. J Med Res 7:138-144, 1902.

22. Yaeger RG. A method of isolating trypanosomes from blood. J Parasitol 46:370-371, 1960.

SUGESTÕES PARA LEITURA

1. Fleck SL. Moody AH. Diagnostic Techniques in Medical Parasitology. 11th ed. Cambridge, England: ELBS, 1988.

2. Knell AJ. Malaria. Oxford: Oxford University Press, 1991.

3. Lambert RA. Parasitologia: Identificação dos Portozoários. Porto: Editora Livrarua Lopes da Silva, 1973.

4. Shute PG. The staining of malaria parasites. Trans R Soc Trop Med Hyg 60:412-416, 1966.

5. Singh J, Brattacharji LM. Rapid Staining of Malarial Parasites. Indian Med Gaz. 79:102-104, 1944.

6. Smith JW, Melvin DM, Orihel TC et al. Blood and Tissue Parasites. Diagnostic Medical Parasitology. Chicago (Ill): ASCP Press, 1976.v.1.

7. Walker AJ. The teaching of malarial diagnosis. Am J Trop Med 28:777, 1948.

8. Walker AJ. Laboratory diagnosis of malaria. Am J Clin Path 22:495, 1952.

9. Wilcox A. Blood films in malaria. Trop Med News 1:19, 1944.

10. Wilcox A. Manual for The Microscopical Diagnosis of Malaria in Man. Washington (DC): US Department of Health, Education and Welfare, 1960.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CAPÍTULO 13



Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi

Mário Steindel
Edmundo Carlos Grisard

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O diagnóstico parasitológico na fase aguda da doença de Chagas baseia-se na detecção de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, por meio da observação microscópica de amostras de sangue ou de métodos indiretos. Nesta fase da infecção os parasitos podem estar presentes em número considerável na corrente sangüínea, não sendo, entretanto, uma regra geral. A infecção chagásica em sua fase crônica apresenta parasitemias sangüíneas usualmente muito baixas e irregulares. Dessa forma, a detecção parasitológica do *T. cruzi* nesta fase é feita por métodos indiretos (hemocultura e xenodiagnóstico). Embora apresentem alta especificidade, estes métodos são laboriosos e sua sensibilidade, baseada em apenas um exame, varia de 40% a 50% nos diferentes estudos realizados[15,16].

A despeito do número reduzido de parasitos na infecção chagásica crônica, elevados títulos de anticorpos anti-*T. cruzi* estão presentes nesta fase. A detecção desses anticorpos pode ser feita através de várias técnicas sorológicas, as quais apresentam elevada sensibilidade e especificidade. Apesar disso, a ocorrência de resultados falso-positivos e falso-negativos tem sido demonstrada[7]. Neste capítulo abordaremos as principais técnicas parasitológicas, imunológicas e moleculares utilizadas atualmente no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

MÉTODOS PARASITOLÓGICOS

MÉTODOS DIRETOS

Na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, que compreende aproximadamente os dois primeiros meses da infecção, formas tripomastigotas do parasito podem estar presentes no sangue periférico do paciente[4,7]. Nesta fase, técnicas de demonstração do parasito podem ser particularmente úteis para o diagnóstico rápido da parasitose.

Exame direto ou a fresco — Para realização desta técnica, uma pequena gota de sangue, obtida por punção da polpa digital ou de sangue venoso colhido com anticoagulante, é colocada entre lâmina e lamínula e examinada exaustivamente ao microscópio em objetiva de (40X). Pelo fato de as formas tripomastigotas serem bastante móveis, estas, quando presentes, podem ser facilmente detectadas entre os elementos figurados do sangue[45]. Entretanto, em face dos pequenos volumes de sangue examinados a cada vez, o método necessita ser repetido várias vezes ao dia ou mesmo em dias consecutivos até que o parasito seja detectado[45].

Método de Strout modificado — Consiste em coletar o sangue em tubo capilar e após centrifugação a baixa rotação, examinar entre lâmina e lamínula o material da interface entre as hemácias e o creme leucocitário (*buffy coat*). Em pacientes na fase aguda da infecção, taxas de positividade da ordem de 70% têm sido demonstradas[8] (Fig. 13.1).

Preparações coradas — O esfregaço delgado (ou estirado) e a gota espessa devem ser preparados e corados pelo método de Giemsa ou de Leishman. O exame do material corado permite, além da detecção, a diferenciação morfológica entre tripomastigotas sangüíneas de *T. cruzi* e *T. rangeli.* A desvantagem dos esfregaços corados é que estes normalmente requerem parasitemias elevadas para evidenciação do parasito. No entanto, a utilização de diferentes métodos parasitológicos isolados ou combinados, na fase aguda da tripanossomíase americana, pode levar à detecção rápida e precoce da infecção. (Fig. 13.2)

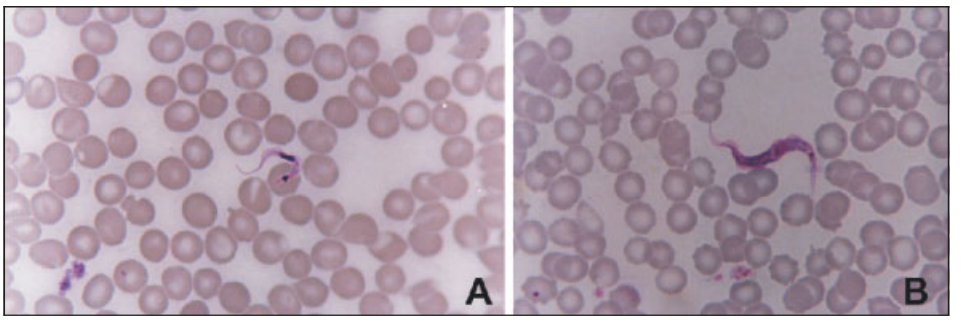


Fig. 13.1 — *A) Forma tripomastigota sangüínea de* Trypanosoma cruzi*; B) Forma tripomastigota sangüínea de* Trypanosoma rangeli *(Esfregaços corados pelo método de Giemsa. Aumento 1.000X.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

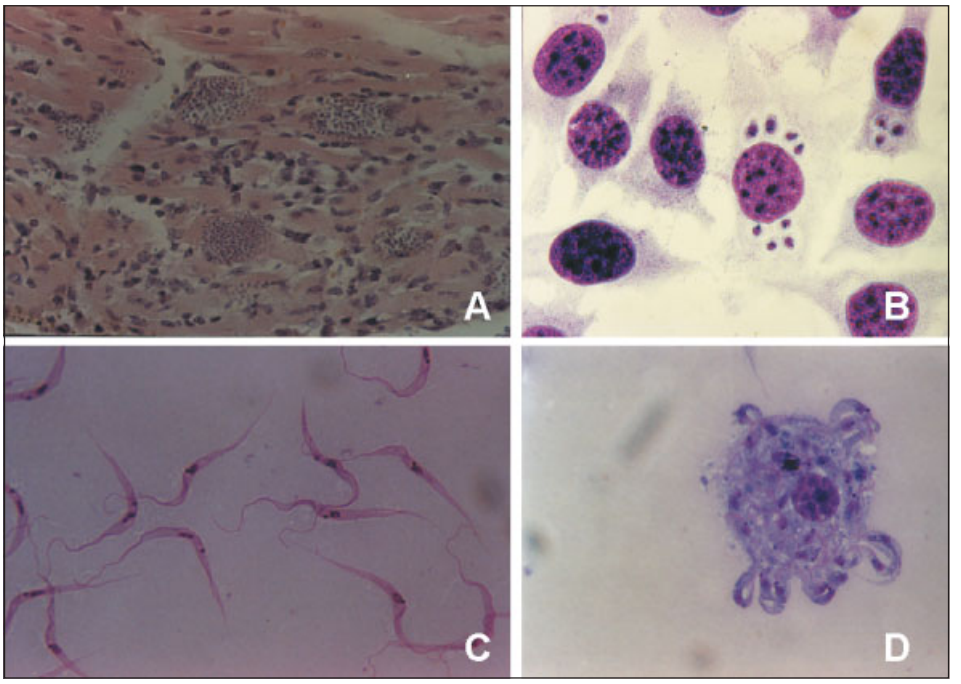


Fig. 13.2 — *A) Ninhos de formas amastigotas de* Trypanosoma cruzi *em tecido cardíaco, corados pela hematoxilina-eosina (HE). Aumento 400X; B) Formas amastigotas intracelulares de* Trypanosoma cruzi *em cultura de células, coradas pelo método de Giemsa. Aumento 1.000X; C) Formas do* Trypanosoma rangeli *encontradas livres na hemolinfa de triatomíneo, coradas pelo método de Giemsa. Aumento 1.000X; D) Formas epimastigotas de* Trypanosoma rangeli *em hemócito de triatomíneo, coradas pelo método de Giemsa. Aumento 1.000X.*

Métodos Indiretos

A fase crônica da doença de Chagas caracteriza-se por uma parasitemia sangüínea baixa e irregular, dificultando sobremaneira o encontro do parasito pelos métodos diretos. Nesta situação, métodos indiretos que permitam a multiplicação do flagelado são particularmente úteis na detecção do parasito.

Xenodiagnóstico — Este método introduzido por Brumpt[3] é largamente empregado ainda nos dias atuais no diagnóstico da doença de Chagas. A multiplicação do *T. cruzi* no trato digestivo do triatomíneo permite sua detecção nas fezes ou na urina dos insetos alimentados com sangue do paciente ou de animais suspeitos após um período de um a dois meses. O xenodiagnóstico é uma técnica perfeitamente aplicável para a pesquisa de campo e/ou isolamento de amostras de *T. cruzi* de pacientes e/ou animais. Entretanto, sua utilização em pacientes pode ocasionar com certa freqüência o desenvolvimento de reações alérgicas decorrentes da saliva dos triatomíneos, levando à rejeição do exame pelo paciente. Neste método, recomenda-se a utilização de 30 a 40 ninfas do 3.º ao 5.º estágio de desenvolvimento, as quais são criadas em condições controladas em laboratório, sendo portanto livres do parasito[12,42,44].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

As ninfas em jejum alimentar de 20 a 30 dias são acondicionadas em pequenas caixas cobertas com tela, as quais são aplicadas diretamente sobre o hospedeiro por 30 a 60 minutos, até completar-se a alimentação dos insetos. Em humanos, a caixa é aplicada no antebraço e em animais deve-se escolher um local onde os pêlos não dificultem a alimentação dos triatomíneos. O exame dos insetos para pesquisa do *T. cruzi* é realizado aos 30 e 60 dias após o repasto sangüíneo, devendo ser realizado individualmente ou em grupos, dependendo do propósito do estudo. As fezes ou urina dos triatomíneos são obtidas através de uma leve compressão do abdômen dos insetos, adicionadas de uma gota de solução salina e em seguida examinadas a fresco ao microscópio óptico entre lâmina e lamínula, ou utilizadas para a confecção de preparações coradas.

Devido à recusa em humanos, pode-se alternativamente realizar o xenodiagnóstico de maneira artificial[9]. Para tanto, o sangue do paciente é colhido com anticoagulante, mantido a 37°C e oferecido aos insetos através de uma membrana. As percentagens de positividade, embora um pouco mais baixas, se equiparam às observadas no xenodiagnóstico convencional. Em face da existência de infecções mistas *T. cruzi*/*T. rangeli* em várias espécies de hospedeiros vertebrados, incluindo o homem, é prudente realizar-se o exame da hemolinfa e das glândulas salivares dos triatomíneos utilizados no xenodiagnóstico, especialmente se pertencerem ao gênero *Rhodnius*[25,43].

Além disso, a infecção natural de triatomíneos pelo flagelado *Blastocrithidia triatominae*, já observada em diferentes laboratórios, pode levar a diagnósticos equivocados[11,38]. Assim, colônias destes insetos para fins de xenodiagnóstico devem ser mantidas isoladas e monitoradas regularmente para a presença deste protozoário e cuidados com a esterilização das soluções utilizadas no exame dos insetos são recomendados.

Xenocultura — A técnica da xenocultura pode ser utilizada tanto para o diagnóstico como para o isolamento de amostras do parasito[2]. Neste procedimento, o intestino dos insetos é retirado em condições assépticas e o material semeado em meio de cultura. Essa metodologia apresenta uma sensibilidade superior à do exame direto, especialmente quando a densidade de flagelados nos insetos é baixa. Para realização da xenocultura, os triatomíneos são inicialmente esterilizados em solução de White ($HgCl_2$ — 0,25g; NaCl — 6,50g; HCl concentrado — 1,25ml; Etanol 95% — 250ml; Água destilada — 750ml), por 90 minutos. Grupos de cinco a 10 triatomíneos são dissecados e os conteúdos intestinais dos insetos macerados em tampão PBS pH 7,4 estéril. Amostras de 0,2 a 0,5ml do material são então semeadas em tubos contendo 3ml de meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*)[4], acrescido de ampicilina sódica na concentração de 6,6mg/ml e mantidos a 28°C. Após 15 dias do inóculo realiza-se o exame a fresco das culturas para a pesquisa de flagelados. Este procedimento tem demonstrado grande utilidade no isolamento de amostras.

Hemocultura — O *T. cruzi* é capaz de crescer e de multiplicar-se em diferentes meios de cultura acelulares que contenham hemina ou derivados da hemoglobina. A hemocultura é uma técnica mais difícil de ser realizada,

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

uma vez que requer condições assépticas para a coleta e o manuseio da amostra de sangue, o que a torna pouco prática nos trabalhos de campo. A técnica consiste em coletar cerca de 10ml de sangue venoso do paciente com anticoagulante e semear alíquotas de cerca de 1 a 2ml de sangue total em tubos contendo 5ml de meio LIT. As culturas são mantidas a 28°C e examinadas em intervalos de 15 dias até um total de quatro meses. As percentagens de positividade obtidas na hemocultura convencional por diferentes estudos são muito semelhantes àquelas observadas para o xenodiagnóstico[13,14,15].

Galvão e cols.[24], modificando a técnica convencional de hemocultura, obtiveram taxas de positividade bem mais elevadas[16]. Neste método, coleta-se de cada paciente 30ml de sangue venoso na presença de heparina ou EDTA. O plasma é removido através de centrifugação a 1.000rpm por 10 minutos a 4°C, realizando-se a seguir uma nova lavagem do sedimento celular com meio LIT. A remoção do plasma faz-se necessária para retirada de fatores líticos (anticorpos e complemento) capazes de destruir formas epimastigotas de *T. cruzi*. A seguir, o sedimento é novamente adicionado de meio LIT e distribuído em alíquotas de 5ml e mantido a 28°C. O exame das culturas para pesquisa de *T. cruzi* é realizado em intervalos de 15 dias até um total de quatro meses. Caso o sangue não possa ser processado imediatamente, este deverá ser mantido a 4°C. Em um estudo comparativo em 40 pacientes chagásicos crônicos, os autores obtiveram percentuais de positividade de 30% e 50% para o xenodiagnóstico e a hemocultura, respectivamente.

Recentemente, Luz e cols.[32], realizando três hemoculturas repetidas em um grupo de 52 pacientes chagásicos não-tratados do Estado de Minas Gerais com idade de 18 a 82 anos, obtiveram taxas de positividade de até 94%. Fernandes e cols.[20], estudando um grupo de 74 pacientes chagásicos não-tratados do Estado do Rio Grande do Sul, com idade variando de quatro a 20 anos, obtiveram uma taxa de positividade de 73% realizando apenas uma hemocultura. Estes resultados mostram que a hemocultura pode ser um método parasitológico de grande utilidade no diagnóstico, assim como no monitoramento de pacientes após o tratamento específico[33].

Inoculação em animais de laboratório — A inoculação de camundongos ou cobaias jovens tem sido utilizada por alguns pesquisadores. Face aos avanços científicos atuais, esta metodologia não é mais empregada para o diagnóstico da infecção chagásica. Entretanto, a inoculação de animais pode ser perfeitamente utilizada para isolamento de amostras de *T. cruzi* a partir de sangue positivo, tanto de pacientes como de outros reservatórios do parasito.

Métodos Sorológicos

O diagnóstico sorológico da infecção chagásica baseia-se na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* das classes IgM e IgG no soro do paciente, dependendo da fase da infecção. Os testes sorológicos em geral apresentam uma alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico laboratorial da infecção chagásica humana. No entanto, fatores como a imunocompetência do hospedeiro, a qualidade do antígeno, reagentes, calibração de instrumentos,

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

como micropipetadores, entre outros, podem interferir na qualidade do teste. Dessa forma, a padronização da metodologia a ser empregada é de fundamental importância, garantindo sua reprodutibilidade e permitindo a comparação de resultados entre diferentes laboratórios.

É sabido que a presença de outras parasitoses, como esquistossomose, leishmaniose, toxoplasmose e rangeliose, apresenta reações sorológicas com o *T. cruzi*[5,6,27,41]. A coexistência de várias dessas doenças, como ocorre em grande parte dos países latino-americanos, torna-se um problema adicional no diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi*, levando ao aparecimento de resultados falso-positivos[6]. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o uso de pelo menos dois testes sorológicos diferentes, em paralelo, para o diagnóstico sorológico da infecção pelo *T. cruzi*. Resultados de testes sorológicos duvidosos ou muito próximos do limite de positividade (*cut off*) devem ser repetidos inclusive utilizando-se novas amostras e um número maior de testes. Do ponto de vista prático, os testes de imunofluorescência indireta (IFI) e ELISA podem ser tomados como referência ou padrão-ouro (*gold standard*) dos testes sorológicos para detecção da infecção pelo *T. cruzi*. Esses dois testes são atualmente os mais utilizados em bancos de sangue e em diferentes laboratórios de pesquisa.

Reação de fixação do complemento (RFC) — Essa técnica, idealizada por Guerreiro e Machado[26] para o diagnóstico da doença de Chagas, foi durante muito tempo a única técnica sorológica para detecção da infecção pelo *T. cruzi* disponível no mercado. O método utiliza um antígeno homólogo (extrato de formas de cultura de *T. cruzi*), sendo que a sensibilidade e especificidade desta técnica são tidas como controversas entre diferentes autores devido a várias dificuldades técnicas, como a falta de padronização de antígeno, a discordância de resultados entre diferentes laboratórios, fazendo com que a técnica, apesar de barata, esteja em desuso.

Teste de hemaglutinação (HA) — É uma técnica de elevada sensibilidade, largamente empregada na triagem de doadores em bancos de sangue, bem como no diagnóstico da infecção crônica. O método consiste em sensibilizar hemácias de carneiro fixadas com um extrato antigênico de *T. cruzi*. As hemácias sensibilizadas são depositadas em placa de 96 orifícios com o fundo em forma de "U", na presença do soro-teste em diferentes diluições. Os anticorpos anti-*T. cruzi*, se presentes no soro, irão promover a aglutinação das hemácias formando uma rede. Estudos comparativos mostraram que a sensibilidade da HA é comparável à da imunofluorescência indireta[10,35]. Além de utilizar antígenos padronizados, a técnica de HA pode ser automatizada pela sua simplicidade de leitura, não requerendo, entretanto, aparelhagem sofisticada.

Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) — Essa técnica de elevada sensibilidade é largamente utilizada tanto na triagem de doadores de sangue como no diagnóstico da infecção aguda e crônica pelo *T. cruzi*. As diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* (amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas) foram testadas independentemente como antígenos para a

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

detecção da infecção chagásica humana, tendo apresentado resultados similares[1,6,22,37]. A padronização da RIFI com formas epimastigotas se deve à praticidade de cultivo e obtenção dessas formas em laboratório. Para preparação de antígeno, formas epimastigotas de cultura de *T. cruzi* colhidas na fase exponencial de crescimento são lavadas em PBS e fixadas em paraformaldeído a 2%. Os parasitos são distribuídos sobre orifícios de lâminas próprias para imunofluorescência, secos à temperatura ambiente e incubados a 37°C por uma hora com o soro diluído. Após três lavagens de cinco a 10 minutos em PBS, as lâminas são incubadas com um conjugado fluoresceinado anti-IgG ou anti-IgM humana por 60 minutos, novamente lavadas para remoção do conjugado não ligado, montadas em glicerina alcalina e observadas em microscópio de fluorescência. Para cada lâmina recomenda-se fazer um controle positivo e negativo do teste. Assim como em outros testes na RIFI, ocorrem reações cruzadas com soros de pacientes infectados por *Leishmania* spp. e pelo *T. rangeli*.

Ensaio imunoenzimático (ELISA) — Este método imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) é altamente sensível e específico e permite pesquisar as subclasses de imunoglobulinas envolvidas na resposta imune direcionada contra o *T. cruzi*. O ensaio é realizado em placas de poliestireno, onde os orifícios da placa são sensibilizados com preparações antigênicas obtidas a partir de formas de cultura de *T. cruzi* ou com proteínas recombinantes, sendo este método semelhante à RIFI no seu conceito. No entanto, utiliza-se um conjugado marcado com uma enzima, em geral a peroxidase. Após a adição de um substrato específico, que é consumido na presença da enzima, a reação gera um produto colorido. A leitura da densidade óptica de cada orifício é feita por um processo automatizado em espectrofotômetro para leitura de placas. Um dos grandes problemas no diagnóstico sorológico são as reações inconclusivas ou de título limítrofe. Nestes casos a confirmação diagnóstica deve ser feita com novas amostras, antígenos clonados ou mesmo peptídeos sintéticos[21,36]. Durante os últimos anos vários grupos brasileiros e de outros países sul-americanos têm envidado esforços no sentido de produzir antígenos específicos para detecção específica da infecção pelo *T. cruzi*[22,29,30]. Recentemente, Umezawa e cols.[44] avaliaram vários antígenos recombinantes específicos contra um painel de 541 soros chagásicos e não chagásicos, representativos de nove países das Américas Central e do Sul. Os resultados mostraram que nenhum dos seis antígenos utilizados isoladamente foi capaz de detectar 100% das infecções, comprovando mais uma vez a heterogeneidade antigênica do *T. cruzi* e as implicações desta variabilidade no diagnóstico da enfermidade. Desta forma, uma mistura de antígenos deverá ser utilizada em um *kit* diagnóstico, visando minimizar a influência da variação individual de cepas do parasito e promover uma elevação da sensibilidade do teste para detecção da infecção pelo *T. cruzi*. Outros métodos para detecção de antígenos de *T. cruzi* no sangue e urina de pacientes chagásicos têm sido estudados[23,28]. A pesquisa de antígenos solúveis de *T. cruzi* na urina tem apresentado resultados muito promissores e poderá se constituir em uma interessante abordagem para estudos de outras doenças infecciosas.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Reação em cadeia da polimerase (PCR) — A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi descrita na década de 80 e tem sido amplamente utilizada no diagnóstico de importantes doenças bacterianas, virais e parasitárias que afetam o homem, bem como na caracterização de seus diferentes agentes etiológicos[34,40]. O método baseia-se na geração exponencial de cópias de fragmentos de DNA ou RNA através de uma síntese enzimática *in vitro*. Para tanto, utilizam-se oligonucleotídeos complementares a regiões flanqueadoras do fragmento do gene ou seqüência-alvo, os chamados iniciadores (*primers*), que na presença ainda de uma DNA polimerase termoestável (*Taq* DNA polimerase), de deoxinucleotídeos trifosfatados e de um tampão próprio geram, através da alternância de temperatura, cópias do fragmento do DNA molde compreendido entre os sítios de ligação dos iniciadores. A alteração da temperatura promove a desnaturação da fita molde, ligação dos iniciadores à fita molde e posterior síntese da nova fita complementar pela atuação da enzima ao incorporar cada nucleotídeo da nova fita. Ao final de cada ciclo de amplificação, cada fita molde gera duas novas fitas, idênticas em suas seqüências. O diagnóstico então é realizado pela observação de fragmentos de tamanho molecular esperados, revelados através da eletroforese do produto de amplificação em géis de agarose ou poliacrilamida. São inúmeros os iniciadores descritos na literatura e dirigidos a seqüências de DNA nuclear, kDNA (DNA cinetoplástico) ou ao RNA do *T. cruzi*, apresentando resultados variáveis e distintos quanto à sua especificidade e ao seu poder diagnóstico. Dentre esses, podemos citar alguns dirigidos aos genes do miniexon ou do rRNA 24S, aos minicírculos de kDNA ou ainda a seqüências repetitivas do DNA nuclear, os quais têm apresentado resultados promissores, podendo detectar, em condições experimentais, até cerca de 1 a 0,1fg do DNA total do *T. cruzi*, o que equivale a cerca de 1/3 a 1/300 do DNA de um único parasito, respectivamente. Muitos iniciadores apresentam reatividade cruzada com outros organismos geneticamente relacionados, como, por exemplo, o *T. rangeli* ou parasitos do gênero *Leishmania*. Apesar de sua alta sensibilidade, a PCR ainda é um método de elevado custo quando comparado com os métodos sorológicos convencionais. Considerando somente os reagentes e materiais utlizados, a PCR tem um custo aproximado de oito a 10 dólares/reação, não sendo assim amplamente difundida entre laboratórios de análises clínicas. Assim como nas reações sorológicas, a PCR necessita ser adaptada e otimizada a cada objetivo proposto, podendo apresentar resultados falso-positivos ou falso-negativos devido à presença de contaminantes ou à inibição da amplificação, respectivamente. A contaminação de uma reação de PCR ocorre pela presença de fragmentos de DNA anteriormente amplificados em uma nova reação. Essa contaminação (*carry-over*) é evidenciada quando o controle negativo da reação, composto por todos os componentes, à exceção do DNA molde, torna-se positivo, apresentando a banda correspondente ao fragmento esperado. Este DNA contaminante pode estar presente em equipamentos, materiais ou reagentes utilizados na preparação e/ou execução da reação. Nesse sentido, cuidados básicos, como a correta e necessária separação de ambientes, materiais, reagentes e equipamentos utilizados nos procedimentos pré e pós-amplifica-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

ção, são extremamente eficazes. Além disso, são descritos na literatura alguns processos físicos e/ou químicos de descontaminação, dentre os quais podemos citar os protocolos baseados na utilização da uracil-DNA-glicosilase (UDG), de derivados do isopsoralen ou, ainda, a hidrólise alcalina pós-PCR[18,31,39]. De uma maneira geral, a inibição da reação de PCR é devida à presença de componentes que não permitem a *Taq* DNA polimerase realizar a incorporação nucleotídica. Apesar de a literatura não descrever quais, quantos e como agem os inibidores, sabe-se que alguns compostos, como hemoglobina, heparina, formol e fenol, presentes nos tecidos ou utilizados nos processos de extração de DNA, inibem a reação quando presentes. Assim sendo, a utilização de EDTA como anticoagulante, quando da coleta de sangue, ou a coleta e conservação em solução de Guanidina/EDTA, a fixação de tecidos de biópsia com etanol ao invés de formol e a correta realização de protocolos de extração de DNA, evita a presença de inibidores da reação de amplificação. Até o momento, a adoção de *kits* comerciais que não utilizam solventes orgânicos na extração de DNA ou RNA são medidas que podem minimizar a inibição da PCR. Controles utilizando iniciadores dirigidos a genes constitutivos, como, por exemplo, o da gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH) humana, podem ser utilizados com o intuito de constatar essa inibição. A utilização da PCR no diagnóstico da infecção chagásica tem sido avaliada por diferentes autores, apresentando resultados diversos devidos à particularidade da infecção pelo *T. cruzi*. Além de fatores intrínsecos do próprio parasito (infectividade, parasitemia, histiotropismo) e do hospedeiro (imunidade, susceptibilidade), deve-se ainda considerar a relação parasito-hospedeiro, as quais influem diretamente na detecção do parasito. O poder diagnóstico da PCR está ligado ainda à escolha do gene ou seqüência-alvo para o diagnóstico, seu número de cópias e sua localização, assim como a seqüência dos iniciadores utilizados. Nesse sentido, a PCR apresentou em um ensaio comparativo uma sensibilidade de 82%, quando comparada à sorologia convencional realizada por três métodos distintos (IFI, ELISA e HAI) na detecção do *T. cruzi* em amostras de pacientes chagásicos e não chagásicos[17,19]. Salientando que a detecção do DNA do *T. cruzi* por PCR não significa necessariamente uma infecção ativa, conclui-se que a PCR apresenta-se como uma ferramenta de alta sensibilidade e especificidade, assim como um grande potencial para o diagnóstico da infecção chagásica; entretanto, ainda necessitando de padronização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Araujo FG, Guptil D. Use of antigen preparations of the amastigote stage of *Trypanosoma cruzi* in the serology of Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg, 33:362-371, 1984.
2. Bronfen E, Rocha FSA, Machado GBN et al. Isolamento de amostras de *Trypanosoma cruzi* por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da Doença de Chagas. Mem Inst Oswaldo Cruz, 84:237-240, 1989.
3. Brumpt E. O xenodiagnóstico. Aplicação ao diagnóstico de algumas infecções parasitárias e, em particular, à tripanosomose de Chagas. An Paul Med Cirurg, 3:97-102, 1914.
4. Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypannosomoses in liquid media. Rev Inst Med Trop São Paulo, 6:93-100, 1964.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

5. Camargo ME, Hoshino-Shimizu S. Metodologia sorológica na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev Goiana de Med, 20:47-65, 1974.

6. Camargo ME, Takeda GKF. Diagnóstico de laboratório. In: Brener Z, Andrade Z eds. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 175-198, 1979.

7. Camargo ME. Diagnostic tests for Chagas disease. In: Wendel S, Brener Z, Camargo ME et al. eds. Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil'92 São Paulo, Brazil, 65-178, 1992.

8. Cedillos RA, Dimas D, Hernandez AY. Blood concentration method in the diagnosis of Chagas disease. Rev Lat Amer Microbiol, 12:200-203, 1970.

9. Cedillos RA, Torrealba JW, Tonn RJ et al. El xenodiagnóstico artificial en la enfermedad de Chagas. Bol of Sanit Panam, 93:240-248, 1982.

10. Cerisolla JA, Chaben MF, Lazzari JO. Test de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Pren Med Argent, 44:1761-1767, 1962.

11. Cerisolla AJ, Del Prado CE, Rohwedder R et al. Blastocrithidia triatominae n.sp. found in *Triatoma infestans* from Argentina. J Protozool, 18:503-506, 1971.

12. Cerisolla JA, Rohweidder RW, Del Prado CE. Rendimiento del xenodiagnostico en la infección chagásica cronica humana utilizando ninfas de diferentes especies de triatomíneos. Bol Chil Parasitologia, 26:57-58, 1971.

13. Chiari E, Brener Z. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. Rev Inst Med Trop São Paulo, 8:134-138, 1966.

14. Chiari E, Dias JCP. Nota sobre uma nova técnica de hemocultura para diagnóstico parasitológico na doença de Chagas na sua fase crônica. Rev Inst Med Trop S Paulo, 9:133-136, 1975.

15. Chiari E, Dias JCP, Lana M et al. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. Rev Inst Med Trop S Paulo, 22:19-23, 1989.

16. Chiari E. Diagnostic tests for Chagas disease. In: Wendel S, Brener Z, Camargo ME et al. eds. Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil'92 São Paulo, Brazil, 153-164, 1992.

17. Chiari E. Chagas Disease Diagnosis Using Polymerase Chain Reaction, Hemoculture and Serologic Methods. Mem Inst Oswaldo Cruz, 94:299-300, 1999.

18. Cimino GD, Metchette KC, Tessman JW et al. Post — PCR sterilization: A method to control carry-over contamination for the polymerase chain reaction. Nucleic Acid Res, 19:99-107, 1991.

19. Fernandes O, Teixeira MMG, Sturm NR et al. Mini-exon gene sequences define six groups within the Genus *Crithidia*. J Euk Microbiol, 44:535-539, 1997.

20. Fernandes CD, Tiecher FM, Fernandes DD et al. High rates of positive hemocultures in children and teenagers seropositive for *Trypanosoma cruzi* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 94:7-8, 1999.

21. Ferreira WA. Diagnostic tests for Chagas disease. In: Wendel S, Brener Z, Camargo ME et al. eds. Chagas disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil'92 São Paulo, Brazil, 179-193, 1992.

22. Franco da Silveira J. Detection of antibodies in sera from Chagas' disease patients using a *Trypanosoma cruzi* immunodominant recombinant antigen. Parasite Immunol, 16:165-169, 1994.

23. Freilij HL, Corral RS, Katzin AM, Grinstein S. Antigenuria in infants with acute and congenital Chagas' disease. J Clin Microbiol, 25:133-137, 1987.

24. Galvão LM, Cançado JR, Rezende DF et al. Hemocultures from chronic chagasic patients using EDTA or heparin as anticoagulants. Braz J Med Biol Res, 22:841-843, 1989.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

25. Grisard EC, Steindel M, Guarneri AA et al. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. Mem Inst Oswaldo Cruz, 94:203-209, 1999.

26. Guerreiro C, Machado A. Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. Brasil Med, 27:225-226, 1913.

27. Guhl F, Hudson L, Marinkelle CJ et al. Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. Parasitology, 94:475-484, 1987.

28. Katzin AM, Marcipar A, Freilij HL et al. Rapide determination of *Trypanosoma cruzi* urinary antigens in human chronic Chagas' disease by agglutinatio test. Exp Parasit, 68:208-215, 1989.

29. Krieger MA, Almeida E, Olemann W et al. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg, 46:427-434, 1992.

30. Levin MJ, Franco da Silveira J et al. Recombinant antigens and Chagas' disease diagnosis: analysis of a workshop. FEMS Microbiol Immunol, 89:11-20, 1991.

31. Longo MC, Beninger S, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosilase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene, 93:125-128, 1990.

32. Luz ZMP, Coutinho MG, Cançado JR, Krettli AU. Alta positividade de hemoculturas repetidas em pacientes chagásicos. Rev Soc Bras Med Trop, 26:66-67, 1993.

33. Luz ZMP. Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity. Mem Inst Oswaldo Cruz, 94:295-298, 1999.

34. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzimol, 155:335-350, 1987.

35. Neal RA, Miles RA. Indirect haemagglutination test for Chagas' disease, with a simple method for survey work. Rev Inst Med Trop São Paulo, 12:325-332, 1970.

36. Oelemann WMR, Teixeira MGM, Peralta JM. Screening and Confirmation in Chagas Disease Serology – A Contribution. Mem Inst Oswaldo Cruz, 94:307-308, 1999.

37. Primavera KSC, Hoshino-Shimizu S, Umezawa ES et al. Immunoglobulin A antibodies to Trypanosoma cruzi antigens in digestive forms of Chagas' disease. J Clin Microbiol, 26:2101-2104, 1988.

38. Rocha e Silva EO, Amaral ADF. Sobre o encontro de um parasita do gênero *Blastocrithidia* em exemplares de *Triatoma infestans* criados em colônias de laboratório. Nota Prévia. Rev Paul Med, 78:92, 1971.

39. Rys PN, Persing DH. Preventing false positives: Quantitative evaluation of three protocols for inactivation of polymerase chain reaction amplification products. J Clin Microbiol, 31:2356-2360, 1993.

40. Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. Enzimatic amplification of b-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230:1350-1354, 1985.

41. Saldaña A, Sousa OE. *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*: cross-reaction among their immunogenic componets. Mem Inst Oswaldo Cruz, 91:81-82, 1996.

42. Schenone H. Xenodiagnosis. Mem Inst Oswaldo Cruz, 94:289-294, 1999.

43. Steindel M, Carvalho-Pinto CJ, Toma HK et al. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (Echimys dasythrix) in Santa Catarina Island, Santa Catarina State: first report of this trypanosome in southern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 86:73-79, 1991.

44. Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME et al. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. J Clin Microbiol, 37:1554-1560, 1999.

45. World Health Organization. Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Reports Series, 811, 1991.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Capítulo 14



Leishmanioses

Mário Steindel
Edmundo Carlos Grisard

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As leishmanioses são infecções parasitárias que ocorrem em inúmeras espécies animais, incluindo o homem, sendo causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. A transmissão do parasito ao hospedeiro vertebrado ocorre pela picada de fêmeas de dípteros (flebotomíneos) pertencentes à família Psychodidae. A doença humana apresenta um largo espectro de manifestações clínicas que incluem formas tegumentares, mucocutâneas e viscerais. As diferentes formas de leishmanioses ocorrem de forma endêmica em cerca de 80 países, onde, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que ocorram anualmente 12 milhões de casos novos e que aproximadamente 350 milhões de pessoas vivam em áreas de risco de transmissão[23]. Entre todas as doenças causadas por protozoários, a leishmaniose é considerada como sendo a terceira em importância médica para o homem, seguida da malária e da amebíase. Embora as formas tegumentares e mucocutâneas raramente levem à morte, a leishmaniose visceral, quando não tratada, ocasiona elevadas taxas de mortalidade[18,23].

Atualmente, são conhecidas nas Américas 20 espécies do gênero *Leishmania* das quais 14 infectam o homem[6,12]. Entretanto, os agentes etiológicos mais freqüentemente isolados de casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) em humanos são *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*,

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

L. mexicana e *L. peruviana*[12]. No Brasil a LTA ocorre de forma endêmica em todos os Estados da Federação à exceção do Estado do Rio Grande do Sul[11,22]. Nas últimas décadas as leishmanioses vêm mostrando uma crescente expansão e urbanização em diferentes regiões do país. Em vista da variedade de manifestações clínicas na LTA, torna-se da maior importância o diagnóstico diferencial de outras patologias, como tuberculose, hanseníase, sífilis, micoses, úlcera tropical, piodermites, picadas de insetos e neoplasias, entre outras[4,5,14,18]. Do ponto de vista prático, o diagnóstico de LTA baseia-se nos aspectos clinicoepidemiológicos, intradermorreação de Montenegro positiva, testes parasitológicos e/ou resposta favorável ao tratamento específico; entretanto, o diagnóstico baseado em técnicas de biologia molecular tem sido cada vez mais utilizado (Fig. 14.1).

MÉTODOS PARASITOLÓGICOS

Obtenção do Material. Para obtenção de material realiza-se a assepsia local da lesão com álcool etílico a 70% ou Povidine, seguido de anestesia local, usualmente realizada com Lidocaína a 2%. A biópsia deve visar as bordas da lesão e pode ser realizada utilizando-se uma lâmina de bisturi ou *punch* de 4 a 6mm de diâmetro. Em caso de múltiplas lesões, recomenda-se fortemente que a obtenção de material seja realizada em lesões mais recentes, uma vez que estas se apresentam mais ricas em parasitos. O fragmento de tecido obtido pode ser subdividido para procedimentos diversos, como histopatologia, preparação de esfregaços por aposição, semeadura em meio de cultura, inoculação em hamster. Vale salientar que amostras visando ao diagnóstico molecular devem ser fixadas em etanol a 70%, pois outras substâncias podem inibir a reação de PCR, como, por exemplo, o formaldeído.

Esfregaço Corado. Para realização de esfregaços por aposição (*imprint*) comprime-se repetida e delicadamente o fragmento de tecido sobre uma lâmina previamente desengordurada, deixando-se o material secar à temperatura ambiente. Para a confecção de esfregaços de boa qualidade, recomenda-se a lavagem do fragmento de tecido em solução salina estéril (NaCl 0,85%) para remoção do excesso de sangue. Após a secagem, os esfregaços são fixados por três minutos com metanol e corados pelo método de Giemsa.



Fig. 14.1 — *A) Lesão inicial típica determinada por* Leishmania *sp. com dois meses de evolução; B) Lesão determinada por* Leishmania *sp. com oito meses de evolução; C) Lesão determinada por* Leishmania *sp. com três meses de evolução.*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Na falta deste corante pode-se utilizar o corante de Leishman. A pesquisa do parasito é feita em objetiva de 100X e em geral requer experiência e paciência do microscopista devido à usual baixa parasitemia. Formas amastigotas de *Leishmania* podem ser encontradas livres ou no interior de macrófagos ou histiócitos. De maneira geral, a demonstração do parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da úlcera. Para preservação permanente do esfregaço recomenda-se a montagem da preparação em bálsamo-do-canadá ou Entellan® (Fig.14.2).

Histopatologia. O fragmento de tecido pode ser processado através de técnicas histológicas convencionais, podendo o material ser corado pela Hematoxilina-Eosina (HE), Giemsa ou Grocott. O exame do material pode revelar, além das leishmanias, outros patógenos como fungos e bactérias, permitindo, desta forma, o diagnóstico diferencial de outras patologias inflamatórias e/ou neoplasias. Em geral, o aspecto histopatológico da LTA consiste de um infiltrado inflamatório mononuclear misto, apresentando granulomas tuberculóides. O encontro de amastigotas depende do tempo de evolução da lesão, bem como da forma clínica da doença.

Cultura. A cultura de *Leishmania* pode ser realizada a partir do fragmento de tecido retirado na biópsia da borda da lesão, que é semeado em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*), NNN (ágar-sangue)+ LIT ou Schneider. A coleta do material pode ser feita através de aspiração de material da lesão utilizando-se uma seringa de 5ml com agulha de 25 x 8', onde, após assepsia e anestesia local, a agulha é introduzida na borda da lesão injetando-se cerca de 1-3ml de salina estéril e, através de movimentos rotacionais, é possível aspirar o material o qual pode ser semeado em meio de cultura[1]. Recentemente Marzochi e cols.[15] desenvolveram uma nova metodologia para coleta da amostra utilizando tubos selados a vácuo (Vacutainer®) pré-adicionados de meio de cultura. Neste caso, o material é aspirado diretamente no tubo. Esta metodologia, além de prática, é particularmente muito útil para trabalhos em condições de campo, pois evita a ocorrência de contaminação. Os tubos semeados são mantidos a 26°C e examinados semanalmente. Alguns isolados de *Leishmania* apresentam cresci-

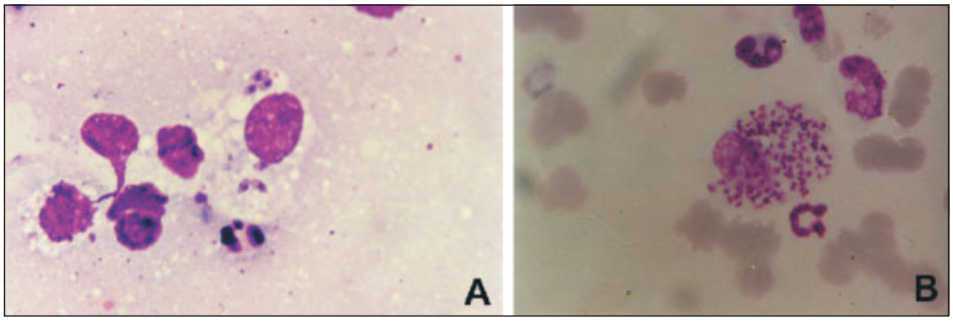


Fig. 14.2 — *A) Esfregaço por aposição de biópsia de lesão demonstrando formas amastigotas intracelulares de* Leishmania *sp. em macrófagos; B) Formas amastigotas de* Leishmania chagasi *em célula mononuclear de medula óssea. Esfregaços corados pelo método de Giemsa. Aumento: 1.000X.*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

mento muito lento e podem apresentar dificuldade para o seu estabelecimento em cultura (Fig.14.3).

Inoculação em Animais. O hamster (*Mesocricetus auratus*) é o animal mais utilizado devido a sua grande suscetibilidade ao parasito. O tecido obtido na biópsia é triturado em solução salina ou tampão fosfato e inoculado por via subcutânea na superfície dorsal das patas traseiras e/ou no focinho do animal. O tempo de aparecimento de lesões nodulares pode variar de dois meses a um ano, dependendo do inóculo e principalmente da espécie de parasito.

LEISHMANIOSE VISCERAL

Na leishmaniose visceral (LV) o agente etiológico pode ser demonstrado em amostras de tecido obtidas por punção de vísceras (baço, fígado e medula óssea)[19]. A biópsia de baço e fígado é procedimento de elevado risco e só deve ser realizada em condições especiais. Face à maior simplicidade e menor risco ao paciente, o material de medula óssea é coletado através de punção do esterno, tíbia ou da crista ilíaca, sendo esta a preferencial em adultos. Com o material coletado devem ser feitos esfregaços corados pelo método de Giemsa, semeadura em meio de cultura NNN+LIT, inoculação em hamster, e, se possível, esfregaços sobre papel *Whatman* n.º 1 esterilizado ou papel de nitrocelulose, visando-se ao diagnóstico por PCR. A cultura deve apresentar-se positiva após um período de até quatro a cinco semanas, sendo que os repiques das culturas devem ser feitos semanalmente. A inoculação de animais, embora não tenha aplicação prática para fins de diagnóstico imediato, pode ser útil para o isolamento do parasito visando a sua caracterização e estudos epidemiológicos.

MÉTODOS IMUNOLÓGICOS

Intradermorreação de Montenegro (IDRM). Este teste avalia a reação de hipersensibilidade retardada do paciente frente a antígenos de

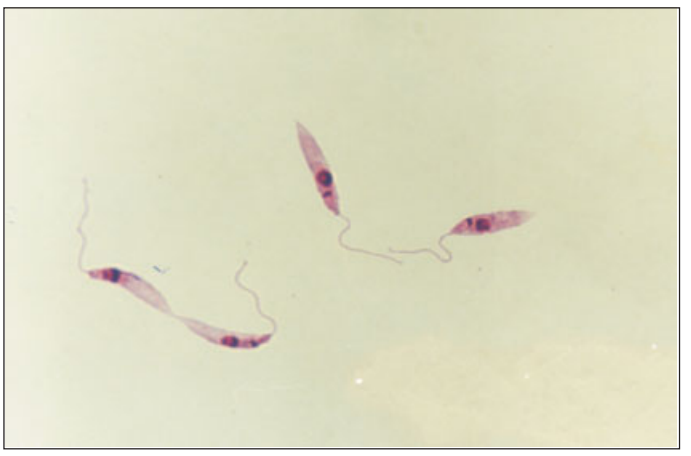


Fig. 14.3 — *Formas promastigotas de cultura de* Leishmania *sp. em meio LIT, coradas pelo método de Giemsa. Aumento 1.000X.*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Leishmania sp. Além de sua utilização com fins diagnósticos, a IDRM pode ser utilizada em inquéritos epidemiológicos e na monitoração de programas de vacinação contra a leishmaniose tegumentar. A intradermorreação é realizada com antígeno padronizado, composto de promastigotas mortos do gênero *Leishmania*, a uma concentração de 240μg de nitrogênio total ou 40μg de nitrogênio protéico por mililitro[16]. Para a realização do teste, cerca de 0,1ml do antígeno é injetado intradermicamente na face anterior do antebraço. A leitura é realizada 48 a 72 horas após a inoculação, medindo-se o diâmetro do halo de enduração com o auxílio de uma caneta esferográfica. Embora não existam medidas limites do teste, a enduração com diâmetro ≥ 5mm é considerada positiva. A intensidade da reação pode variar com a resposta celular do paciente, tempo de evolução da lesão, forma clínica da doença (tegumentar ou mucocutânea) e a qualidade do antígeno. Na forma tegumentar a intensidade da resposta é maior quando o paciente já apresenta úlceras crônicas; na forma mucocutânea, devido ao estado hiper-reativo do paciente, a resposta pode ser tão intensa a ponto de causar flictemas e necrose no local de injeção do antígeno. Contrariamente, na leishmaniose difusa, devido ao estado alérgico do paciente, a resposta é negativa. Da mesma forma na LV o teste intradérmico é geralmente negativo na fase da doença ativa em virtude da imunossupressão causada pelo parasito. Na LV o teste intradérmico volta a ser positivo após a cura da doença.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Estes métodos, largamente empregados no diagnóstico de várias infecções, não são utilizados de forma rotineira no diagnóstico da LTA. Entretanto, esses testes sorológicos podem ser utilizados para detectar anticorpos da classe IgM e IgG anti-*Leishmania*, especialmente no calazar, onde podem auxiliar no diagnóstico da enfermidade assim como em inquéritos soro-epidemiológicos[2]. Apesar de sua elevada sensibilidade, a reação é grupo-específica e, desta forma, reações cruzadas com *T. cruzi* e a leishmaniose tegumentar devem ser esperadas. Este fato é especialmente importante, uma vez que em várias regiões geográficas estas patologias distintas coexistem. Desta forma, a reunião dos vários elementos clínicos e epidemiológicos é de fundamental importância no diagnóstico da parasitose. Na leishmaniose visceral os títulos sorológicos se mantêm elevados frente ao antígeno homólogo tanto na RIFI como no ELISA, mesmo após o tratamento específico. Além destes, vários outros testes como Dot-ELISA, Fast ELISA, contra-imunoeletroforese e aglutinação direta (DAT) têm sido empregados no diagnóstico de leishmaniose visceral humana e canina[3,9,10]. Elevadas especificidade e sensibilidade têm sido demonstradas no sorodiagnóstico da leishmaniose visceral utilizando-se antígenos recombinantes[20]. Além disso, o desenvolvimento de outras metodologias para detecção de antígenos circulantes no sangue e na urina poderão ser de grande utilidade no diagnóstico da leishmaniose visceral.

Métodos Moleculares

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Assim como o anteriormente descrito para o diagnóstico da doença de Chagas, inúmeros são os

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

trabalhos utilizando a PCR no diagnóstico das leishmanioses. Da mesma forma, diferentes genes ou seqüências de DNA têm sido utilizadas com propósitos diagnósticos, apresentando boa sensibilidade. Dentre estas seqüências podemos citar os minicírculos de kDNA, cuja abundância e conservação constituem-se como importantes pré-requisitos. A sensibilidade de detecção do DNA destes parasitos tem girado em torno de fentogramas (fg) de DNA. Recentemente, variações da técnica de PCR ou a associação da PCR com outras técnicas tem permitido, além da detecção do parasito, sua identificação específica. Utilizando-se o DNA extraído de biópsias de lesões, o método é capaz de detectar a presença do DNA de *Leishmania* spp., mesmo quando não são observadas formas amastigotas do parasito ao exame microscópico. A utilização de *imprints* de biópsias realizados em papel de filtro ou de nitrocelulose provou recentemente ser tão eficaz como fonte de DNA molde em reações de PCR quanto à utilização da biópsia propriamente dita. Este fato facilitou a coleta em campo e posterior processamento no laboratório, evitando os problemas de fixação e preservação do material[13]. Assim como foi descrito no capítulo sobre o diagnóstico molecular da infecção pelo *T. cruzi*, a preocupação com a contaminação da reação deve ser abordada com seriedade. A PCR específica, utilizando diferentes pares de iniciadores, pode revelar a espécie do parasito envolvido, como o recentemente descrito por Passos e cols.[17], ao pesquisarem a presença do kDNA do parasito em biópsias de pacientes. Entretanto, deve-se proceder uma reação diferente para cada espécie do parasito a ser considerada. Dentre as variantes da PCR utilizadas na caracterização específica de *Leishmania* spp. a partir de biópsias, podemos citar a multiplex-PCR ou ainda a hibridização dos produtos de amplificação com sondas espécie-específicas[7,8,21]. A multiplex PCR utiliza diferentes pares de iniciadores em uma mesma reação, permitindo o diagnóstico através da detecção do DNA do parasito, assim como a caracterização específica dos parasitos através do padrão distinto de migração eletroforética dos produtos de amplificação gerados com os diferentes pares de iniciadores. Uma outra técnica é a amplificação de um fragmento de um mesmo gene entre as diferentes amostras e posterior hibridização dos produtos de amplificação com sondas espécie ou grupo-específicas. Mesmo que produtos de amplificação apresentem um mesmo padrão de migração eletroforética, eles necessariamente não possuem a mesma seqüência nucleotídica. Assim sendo, as sondas são fragmentos de DNA cuja seqüência é específica de uma ou outra espécie ou grupo, que ao serem utilizadas nos ensaios de hibridização, somente se ligam à seqüência homóloga, revelando assim a identidade do agente etiológico. Em um estudo recente, a PCR foi capaz de detectar a presença de DNA de *Leishmania* spp. em 90,9% das biópsias de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana, comprovados pelo exame à microscopia óptica. A falha da PCR em detectar o DNA do parasito em biópsias positivas foi atribuída à presença de excesso de sangue quando da coleta do material. Embora necessite ainda de padronização, reafirmamos que a PCR apresenta-se como uma ferramenta de alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico de doenças parasitárias, tendo um grande potencial para o diagnóstico das diferentes formas da leishmaniose.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al Jitawi SA, Farraj SE, Ramahi SA. Conventional scraping versus fine needle aspiration cytology in the diagnosis of cutaneous leishmaniosis. Acta Cytol, 39:82-84, 1995.
2. Badaró R, Reed SG, Carvalho EM. Immunofluorescent antibody test in american visceral leishmaniasis; sensivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. Am J Trop Med Hyg, 32:480-484, 1983.
3. Bagchi AK, Tiwari S, Gupta S et al. The latex agglutination test: standardization and comparison with direct agglutination and dot-ELISA in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India. Ann Trop Med Parasitol, 92:159-163, 1998.
4. Bryceson ADM. Leishmaniasis. In: Cook GC ed. Manson's Tropical Diseases. 20th ed. London: Saunders, 1212-1245, 1996.
5. Grevelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. J Am Acad Dermatol, 34:257-272, 1996.
6. Grimaldi G Jr, David JR, MacMahon-Pratt D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species charcaterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. Am J Trop Med Hyg, 36:270-287, 1987.
7. Grisard EC, Steindel M, Shaw JJ et al. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from authocthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina state, southern Brazil. Acta Tropica, 1999.
8. Harris E, Kropp G, Belli A et al. Single-step multiplex PCR assay for characterization of new world *Leishmania* complexes. J Clin Microbiol, 36:1989-1995, 1998.
9. Harrith AE, Kolk AH, Kager PA et al. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg, 80:583-587, 1986.
10. Hommel M, Attar Z, Fargeas C et al. The direct agglutination test: a non-specific test for the diagnosis of visceral leishmaniasis? Ann Trop Med Parasitol, 91:795-802, 1997.
11. Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT et al. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. Mem Inst Oswaldo Cruz, 89:435-443, 1994.
12. Lainson R. On *Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the neotropics. Mem Inst Oswaldo Cruz, 92:377-387, 1997.
13. Marques MJ, Volpini AC, Grisard EC et al. Análise comparativa do diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA) por PCR, usando como fonte de DNA do parasito biópsias e imprint das biópsias em papel de filtro e de nitrocelulose. Rev Soc Bras Med Trop, 31 Suppl III: 79-81, 1998.
14. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). Trans R Soc Trop Med Hyg, 80:859-876, 1986.
15. Marzochi MCA, Teixeira PC, Marzochi KBF et al. Vacuum aspiratory puncture system for *Leishmania* culturing, isolation and transport. Preliminary report. Rev Inst Med Trop São Paulo, 35:301-303, 1993.
16. Melo MN, Mayrink W, Costa CA et al. Padronização do antígeno de Montenegro. Rev Inst Med Trop São Paulo, 19:161-164, 1977.
17. Passos VM, Fernandes O, Larcerda PA et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with american cutaneous leishmaniasis in the state of Minas Gerais, southeast Brazil. Acta Tropica, 72:251-258, 1999.
18. Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of leishmaniasis. Clin Infect Dis, 22:1-13, 1996.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

19. Piarroux R, Gambarelli F, Dumon H et al. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. J Clin Microbiol, 32:746-749, 1994.

20. Raj VS, Ghosh A, Dole VS et al. Serodiagnosis of leishmaniasis with recombinant ORFF antigen. Am J Trop Med Hyg, 61:482-487, 1999.

21. Ramos A, Maslov DA, Fernandes O et al. Detection and identification of human pathogenic *Leishmania* and *Trypanosoma* species by hybridization of PCR-amplified mini-exon repeats. Exp Parasitol, 82:242-250.

22. São Thiago PT, Guida U. Leishmaniose tegumentar no oeste do estado de Santa Catarina. Rev Soc Bras Med Trop, 23:201-203,1990.

23. World Health Organization. Control of leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Reports Series, 793:1-158, 1990.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Capítulo 15



Plasmodium spp.

Cor Jesus Fernandes Fontes

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A descoberta de que a malária é uma hemoparasitose aconteceu em 1880, quando o francês Louis Alphonse Laveran conseguiu observar organismos em movimento ao examinar, a fresco, o sangue de um paciente com a doença. Posteriormente, em 1884, a parasitose foi confirmada por Gerhardt, que conseguiu reproduzir a doença a partir de transfusão de sangue infectado. Em 1891, a presença e a morfologia desses parasitos puderam ser demonstradas em esfregaços sangüíneos corados por um método desenvolvido por Romanowsky. A transmissão da doença, no entanto, só foi elucidada em 1897, por Ronald Ross, que identificou a participação de mosquitos como vetores da doença e descreveu o ciclo do parasito no hospedeiro invertebrado[9]. Os parasitos causadores de malária pertencem ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*. Das 150 espécies causadoras de malária em diferentes hospedeiros, apenas quatro espécies parasitam o homem: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, que ocorre apenas em regiões restritas do continente Africano[3].

PATOGENIA

Apenas o ciclo eritrocítico assexuado é responsável pelas manifestações clínicas e patologia da malária. Os possíveis

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

mecanismos determinantes das diferentes formas clínicas da doença baseiam-se, fundamentalmente, na interação dos seguintes fenômenos patogênicos:

Destruição dos Eritrócitos Parasitados

Embora participe do desenvolvimento da anemia, esta não se correlaciona com a parasitemia, indicando a influência de outros fatores como: a destruição de eritrócitos não parasitados pelo sistema imune ou por aumento da eritrofagocitose esplênica; a participação de auto-anticorpos com afinidades tanto para o parasito como para o eritrócito; a disfunção da medula óssea estimulada por ação de citocinas (diseritropoiese).

Toxicidade Resultante da Liberação de Citocinas

Células imunocompetentes produzem citocinas que agirão direta ou indiretamente sobre o parasito, mas que podem ser nocivas para o hospedeiro. A febre, por exemplo, é resultado da liberação de pirogênio endógeno pelos monócitos e macrófagos, ativados por produtos do parasito. Outras citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF) e as interleucinas 1, 6 e 8, estão associadas a muitos dos sintomas da malária aguda e seus níveis estão geralmente elevados nos casos de malária grave.

Seqüestro dos Eritrócitos Parasitados na Rede Capilar

Durante a esquizogonia sangüínea, o *P. falciparum* induz uma série de modificações na superfície da célula parasitada, que permite sua adesão à parede endotelial dos capilares. Este fenômeno de citoaderência ocorre principalmente na rede capilar de órgãos vitais, como cérebro, rins e fígado, podendo levar à obstrução da microcirculação e conseqüente redução do fluxo de oxigênio. Este mecanismo tem sido implicado na gênese da malária cerebral, insuficiência renal aguda e hepatite, tão comuns nos quadros de malária grave.

Lesão Capilar por Deposição de Imunocomplexos

Em infecções crônicas por *P. malariae* é descrita a ocorrência de lesão renal, produzida pela deposição de imunocomplexos e componentes do complemento nos glomérulos, alterando sua permeabilidade e induzindo a perda maciça de proteína, a qual se apresenta clinicamente como síndrome nefrótica.

QUADRO CLÍNICO

O período de incubação da malária varia de acordo com a espécie de plasmódio, sendo de oito a12 dias para *P. falciparum*, 13 a 17 para *P. vivax* e 28 a 30 dias para *P. malariae*. Uma fase sintomática inicial, caracteriza-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

da por mal-estar, cefaléia, cansaço e mialgia, geralmente precede a clássica febre da malária. O ataque paroxístico agudo é geralmente acompanhado de calafrio e sudorese, dura de 15 minutos a uma hora e é seguido por uma fase febril, com temperatura corpórea, podendo atingir 41°C ou mais. Depois de algumas horas, os sintomas desaparecem e o paciente sente-se melhor. Após esta fase inicial a febre assume um caráter intermitente, com periodicidade dependente do tempo de duração dos ciclos eritrocíticos de cada espécie de plasmódio: 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* (malária terçã) e 72 horas para *P. malariae* (malária quartã). Entretanto, a constatação desta regularidade é pouco comum nos dias atuais, em decorrência de tratamento precoce, realizado ainda na fase de assincronismo das esquizogonias sangüíneas.

Adultos não-imunes, bem como crianças e gestantes, podem apresentar manifestações mais graves da infecção, podendo ser fatal no caso de *P. falciparum*. As formas mais comuns de doença complicada são a malária cerebral, a insuficiência renal aguda, o edema pulmonar agudo, a hipoglicemia, a icterícia e a hemoglobinúria maciça.

EPIDEMIOLOGIA

A endemicidade da malária em uma região é definida com base no índice esplênico, o qual é determinado pela proporção de crianças entre dois e 10 anos com baço palpável. Classifica-se então em *hipoendêmica* quando o índice esplênico é inferior a 10%, *mesoendêmica* entre 11% e 50%, *hiperendêmica* entre 51% e 75% e *holoendêmica* quando superior a 75%. Outra forma de avaliar epidemiologicamente a malária é pelo seu perfil de incidência no decorrer do tempo: *estável*, se o nível de transmissão é alto e não sofre oscilação no decorrer dos anos, e *instável*, como é o caso do Brasil, quando é comum a variação anual da incidência.

Os níveis de endemicidade da malária estão intimamente ligados à densidade vetorial da região, às condições que favorecem o ciclo de transmissão do parasito no inseto e à suscetibilidade do indivíduo à infecção pelo plasmódio. No Brasil, a malária apresenta distribuição heterogênea e dependente das atividades ocupacionais desenvolvidas por populações expostas na Amazônia. Por exemplo, a infecção é freqüente entre garimpeiros e trabalhadores envolvidos em projetos agropecuários e de colonização.

IMUNIDADE

Os mecanismos imunes envolvidos na proteção contra a malária são complexos, mas podem ser simples e didaticamente divididos em duas categorias: a) resistência inata ou imunidade natural e b) imunidade adquirida.

A resistência inata é uma propriedade inerente do hospedeiro e independe de qualquer contato prévio com o parasito. Fatores do hospedeiro, geneticamente determinados, podem influenciar sua suscetibilidade à malária. Por exemplo: algumas populações negras africanas que não apresentam o antígeno de grupo sangüíneo Duffy na superfície de seus eritrócitos são resistentes à

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

infecção pelo *P. vivax*, explicando a raridade deste tipo de malária em certas regiões da África. Certos polimorfismos genéticos, como a anemia falciforme, estão associados a quadros menos graves de malária por *P. falciparum*.

A história natural da malária em regiões de alta transmissão, como na África e em algumas regiões da Ásia, ilustra bem a resposta imunológica naturalmente adquirida pelo homem contra o plasmódio e a dinâmica relação parasito/hospedeiro, que se desenvolve nos indivíduos constante e cronicamente expostos à doença. Nessas áreas, onde o *P. falciparum* é predominante, os recém-nascidos são protegidos da malária grave durante os seis primeiros meses de vida. A transferência passiva de anticorpos IgG da mãe imune para o filho é considerada um dos principais fatores responsáveis pela resistência do recém-nascido. Após os seis meses as crianças são altamente suscetíveis à malária grave, sendo alta a letalidade nos dois primeiros anos de vida. Com o aumento da idade, as crianças sofrem progressivamente menos episódios de malária aguda, embora possam apresentar altas parasitemias, na ausência de sintomas. Atingindo a idade adulta, os sintomas clínicos da doença são menos pronunciados e os níveis de parasitos sangüíneos muito baixos, refletindo, então, o desenvolvimento de uma imunidade "antiparasito", também denominada premunição[3].

MORFOLOGIA

Os plasmódios variam individualmente em tamanho, forma e aparência, de acordo com o seu estágio de desenvolvimento e com suas características específicas:

Esporozoíto — é alongado, mede cerca de 11μm de comprimento por 1μm de largura e apresenta núcleo central único. Sua estrutura interna é semelhante nas diferentes espécies de plasmódio.

Forma exoeritrocítica — após a penetração do esporozoíto no hepatócito o parasito se torna arredondado, sendo denominado trofozoíto. O seu tamanho varia de 30 a 70μm de diâmetro e isto provoca aumento do tamanho do hepatócito infectado. O número de merozoítos formados por hepatócito é, em geral, acima de 10.000 formas.

Merozoíto — independente de sua origem, se pré-eritrocítica ou sangüínea, os merozoítos são células similares e capazes de invadir somente hemácias. São pequenos e arredondados, com 1 a 5μm de comprimento por 2μm.

Formas eritrocíticas — compreendem os estágios de trofozoíto jovem, trofozoíto maduro, esquizonte jovem, esquizonte maduro e gametócitos. As características morfológicas de cada estágio para as diferentes espécies causadoras de malária humana estão esquematizadas na Tabela 15.1.

Microgameta — célula flagelada de 20 a 25μm de comprimento, constituída de uma membrana que envolve o núcleo e o único flagelo, originária do processo de exflagelação.

Macrogameta — célula que apresenta uma estrutura "atrativa" na superfície, por onde se dá a penetração do microgameta (fecundação).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Tabela 15.1
Características Morfológicas das Formas Eritrocíticas das Diferentes Espécies Causadoras de Malária Humana

	Espécie de plasmódio			
	P. falciparum	*P. vivax*	*P. malariae*	*P. ovale*
Formas encontradas no sangue periférico	Trofozoítos jovens, gametócitos.	Trofozoítos jovens, trofozoítos maduros, esquizontes e gametócitos.	Trofozoítos jovens e maduros, esquizontes e gametócitos.	Trofozoítos jovens, trofozoítos maduros, esquizontes e gametócitos.
Aspecto dos eritrócitos infectados	Normal. Granulações de Maurer raras.	Aumentado. Granulações de Schüffner freqüentes.	Normal. Granulações de Ziemann raras.	Aumentado e oval. Granulações de Schüffner.
Trofozoíto jovem	Citoplasma delgado. Cromatina pequena e saliente (forma em anel) ou dupla. Poliparasitismo freqüente. Raramente granulações de Maurer.	Citoplasma espesso. Núcleo com cromatina única e interna. Poliparasitismo raro.	Citoplasma espesso. Núcleo com cromatina média e única. Ocupa 1/3 do volume do eritrócito.	Citoplasma espesso. Núcleo com cromatina única e interna.
Trofozoíto maduro	Raro no sangue periférico. Pequeno e compacto. Citoplasma espesso. Cromatina indistinta.	Citoplasma irregular e com aspecto amebóide. Cromatina isolada.	Citoplasma compacto, arredondado. Cromatina pouco visível. Disposição em faixa equatorial no eritrócito.	Citoplasma irregular e com aspecto amebóide. Cromatina isolada.
Esquizonte	Raro no sangue periférico. Geralmente arredondado. Citoplasma pouco deformado. Cromatina em grânulos grossos.	Forma amebóide. Citoplasma irregular vacuolizado. Cromatina segmentada.	Cromatina pouco segmentada. Posição em banda equatorial. Hipoparasitemia.	Forma amebóide. Citoplasma irregular vacuolizado. Cromatina segmentada.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Tabela 15.1
Características Morfológicas das Formas Eritrocíticas das Diferentes Espécies Causadoras de Malária Humana (Continuação)

	Espécie de plasmódio			
	P. falciparum	*P. vivax*	*P. malariae*	*P. ovale*
Número de merozoitos no esquizonte	6-32 (média = 22)	12-24 (média = 16)	6-12 (média = 8) Em forma de roseta.	6-14 (média = 8)
Macrogametócito	Alongados e curvos, em forma de crescente ou foice, com citoplasma azul intenso e núcleo denso, cercado de pigmento malárico.	Citoplasma abundante, arredondado ou oval, núcleo grande, cromatina pouco densa. Ocupa quase todo volume do eritrócito. Citoplasma cora-se de azul.	Semelhante ao do *P. vivax*, diferindo apenas por seu tamanho menor.	Semelhante ao do *P. vivax*, diferindo apenas por seu tamanho menor.
Microgametócito	Mais curto e menos encurvado, com citoplasma fracamente corado, cromatina difusa e pigmento malárico disseminado.	Citoplasma azul pálido e a cromatina azul frouxa.	Cromatina única, menos distinta e mais difusa.	Cromatina difusa.
Pigmento malárico	Negro, grosseiro e evidente.	Marrom-claro e pouco evidente.	Marrom-escuro, grosseiro e evidente.	Marrom-escuro e evidente.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Oocineto — forma alongada de aspecto vermiforme, móvel, com comprimento entre 10 e 20μm, contendo núcleo volumoso e excêntrico.

Oocisto — estrutura esférica de 40 a 80μm, a qual apresenta grânulos pigmentados em seu interior. Estima-se que um único oocisto possa produzir, em média, 1.000 esporozoítos.

DIAGNÓSTICO DE LABORATÓRIO

Por orientação dos programas oficiais de controle da doença, em situações de epidemia e em áreas de difícil acesso da população aos serviços de saúde, indivíduos com febre são considerados portadores de malária[4]. Entretanto, os sintomas da malária são extremamente inespecíficos, não se prestando à distinção entre essa parasitose e outras infecções agudas do homem[5]. Assim, o diagnóstico de certeza da malária só é possível pela demonstração do parasito, ou de antígenos relacionados, no sangue periférico do paciente. O diagnóstico laboratorial da malária é feito pela pesquisa do parasito no sangue periférico, pelo método da gota espessa ou pelo esfregaço estirado sangüíneo.

Esfregaço Espesso ou Esfregaço Estirado

Esses métodos baseiam-se na visualização do parasito através de microscopia óptica, após coloração com corante vital (azul-de-metileno) e pelo método de Giemsa. Esses são os únicos métodos que permitem a diferenciação específica dos parasitos, a partir da análise da sua morfologia e das alterações provocadas no eritrócito infectado. Em função de sua simplicidade de realização, seu baixo custo e sua eficiência diagnóstica, o exame da gota espessa tem sido utilizado em todo o mundo para o diagnóstico específico da malária. A determinação da densidade parasitária é útil para a avaliação prognóstica e deve ser realizada em todo paciente com malária, especialmente nos portadores de *P. falciparum*. Para tal, o exame padrão da gota espessa será de 100 campos microscópicos, examinados com aumento de 600-700X, o que equivale a 0,25μl de sangue. Um método semiquantitativo de avaliação da parasitemia, expressado em "cruzes" é então obtido, conforme segue:

+	=	1-10 parasitos por 100 campos de gota espessa.
++	=	2-100 parasitos por 100 campos de gota espessa.
+++	=	1-10 parasitos por 1 campo de gota espessa.
++++	=	mais de 10 parasitos por 1 campo de gota espessa.

Uma forma mais precisa para quantificar a parasitemia é feita pela contagem simultânea de parasitos e leucócitos em 200-500 campos da gota espessa. Se a contagem global de leucócitos do paciente é conhecida, a razão parasitos/leucócitos da lâmina permitirá a determinação da parasitemia por mm^3 de sangue[5]. A diferenciação específica dos parasitos é importante para

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

a orientação do tratamento. Uma vez que o *P. falciparum* completa o seu ciclo eritrocítico assexuado aderido ao endotélio capilar, sua detecção no exame do sangue periférico é suspeitada quando apenas trofozoítos e gametócitos são visualizados. Em contrapartida, a visualização de todos os estágios de desenvolvimento de ciclo sangüíneo na gota espessa sugere *P. vivax*, *P. malariae* ou *P. ovale*. As características de diferenciação destas três espécies são melhor visualizadas através do exame do esfregaço sangüíneo e podem ser observadas nas Figs. 15.1, 15.2 e 15.3. Apesar de sua simplicidade e baixo custo, o diagnóstico microscópico da malária é dependente dos seguintes fatores:

a. Habilidade técnica no preparo da lâmina, seu manuseio e coloração.

b. Qualidade óptica e iluminação do microscópio.

c. Competência e cuidado por parte do microscopista.

d. Capacidade de detecção de parasitemia igual ou superior a 10 a 20 parasitos/microlitro de sangue, quando 100 campos microscópicos são examinados por microscopista devidamente treinado.

Em muitos locais onde a malária ocorre é impraticável satisfazer a todos esses quesitos, seja pela precariedade dos serviços de saúde ou pela dificuldade de acesso da população aos centros de diagnóstico[10-13].

QBC® (*Quantitative Buffy Coat*)

Nos últimos 10 anos, métodos rápidos, práticos e sensíveis vêm sendo desenvolvidos. O primeiro deles foi o QBC® (*Quantitative Buffy Coat*), uma técnica que combina a concentração dos parasitos pela centrifugação do sangue em tubos de micro-hematócrito e a coloração de seus ácidos nucléicos (DNA e RNA) pelo fluorocromo alaranjado de acridina. É um teste rápido, sensível e específico, não necessitando de profissional altamente qualificado para sua interpretação. É adequado para situações em que é grande o volume de trabalho, ou com maior probabilidade de baixas parasitemias. Todavia, trata-se de técnica de alto custo financeiro, já que envolve microscopia epifluorescente e tubos previamente preparados com anticoagulante e corantes especiais. Embora vários estudos tenham mostrado a eficiência do QBC® para o diagnóstico da malária, análises mais recentes têm mostrado que, embora mais rápida e mais objetiva, esta técnica ainda não se mostrou superior à gota espessa no diagnóstico parasitológico da malária[1,6].

ParaSight-F® (Becton & Dickinson) e ICT Malaria *Pf*® (ICT Diagnostics).

Um grande avanço na metodologia diagnóstica da malária foi conseguido a partir de 1993, com o desenvolvimento de ensaios rápidos baseados na captura qualitativa de um antígeno do *P. falciparum*, a proteína 2, rica

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

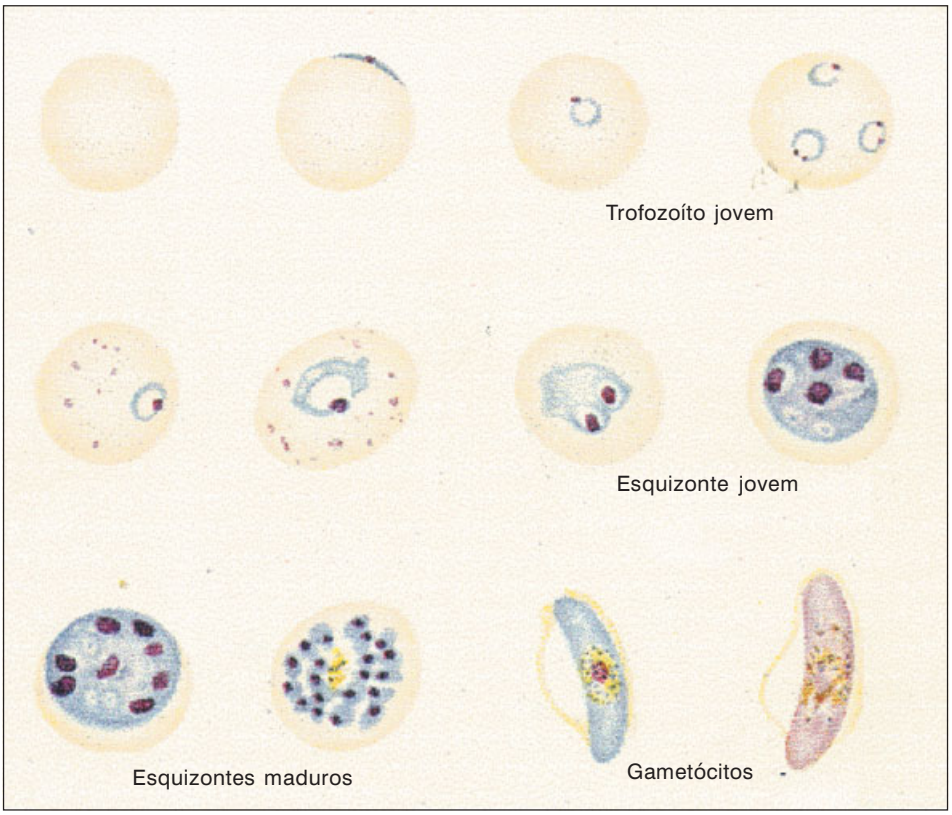


Fig. 15.1 — Plasmodium falciparum.

em histidina (PfHRP2), conhecida comercialmente como *Para*Sight-*F*® (Becton & Dickinson) e ICT Malaria *Pf*® (ICT Diagnostics). Fitas de papel de nitrocelulose contendo anticorpo monoclonal específico contra peptídeos da PfHRP2 são a base do teste. Uma gota de sangue é lisada com deter-

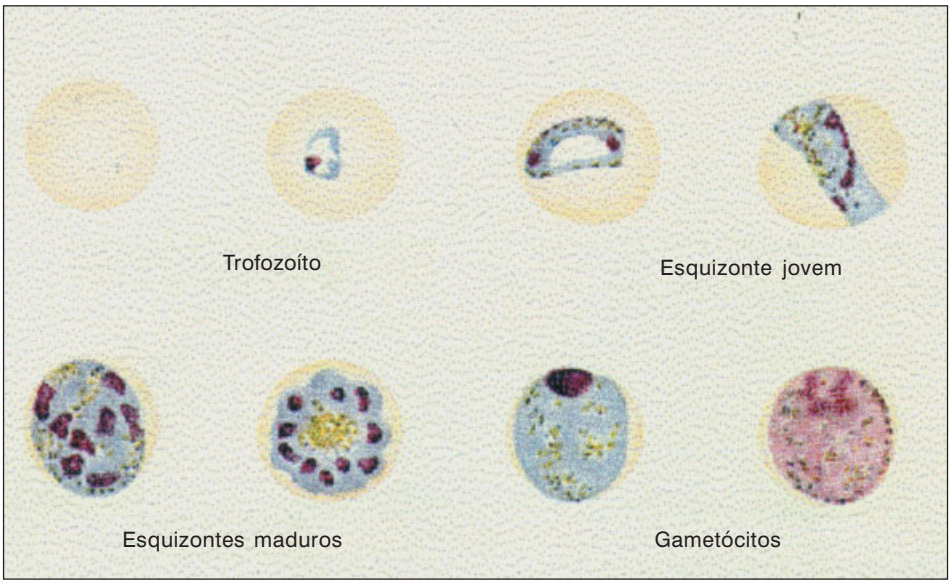


Fig. 15.2 — Plasmodium malariae.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

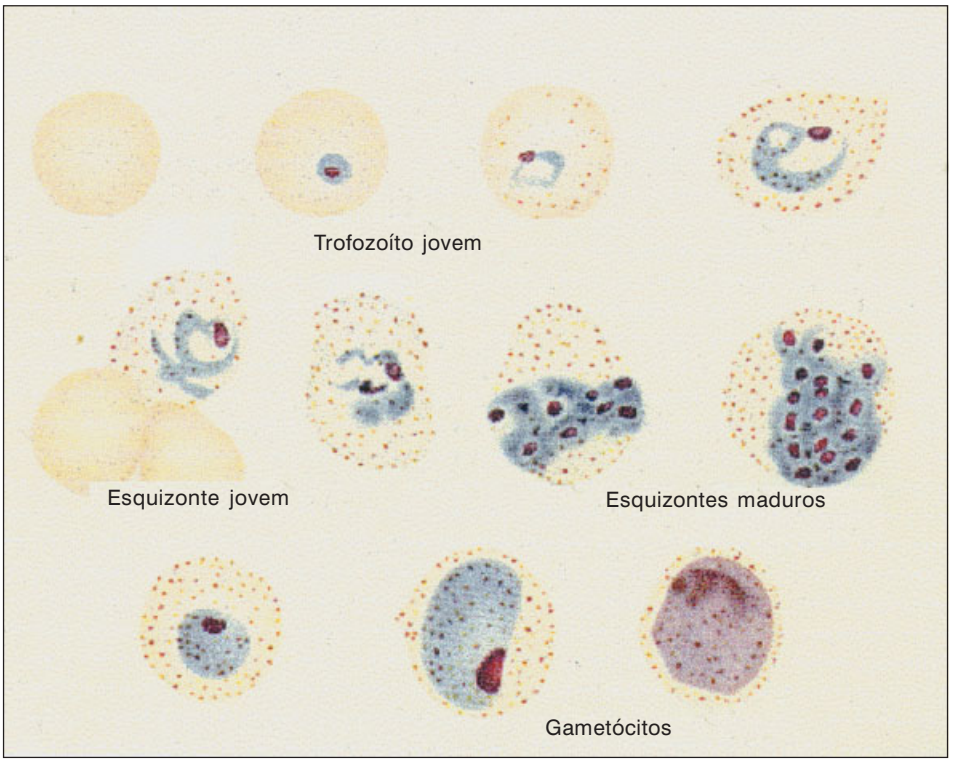


Fig. 15.3 — Plasmodium vivax.

gente e a ela aplica-se a fita, sobre a qual o lisado é lentamente absorvido. A reação da PfHRP2 com o seu anticorpo monoclonal é revelada pela adição de anticorpo policlonal anti-HRP2 conjugado com lipossomas contendo o corante sulforodamine B. Para controle do teste, PfHRP2 é também fixada à fita, 8mm acima do anticorpo monoclonal. Tanto a fita quanto os reagentes são extremamente estáveis, sendo adequados para a realidade de trabalho de campo, onde a temperatura e a umidade são geralmente elevadas e muito variáveis. Sensibilidades superiores a 95% têm sido relatadas quando o *Para*Sight-*F*® é comparado à gota espessa e com parasitemias superiores a 60 parasitos/µl. Entretanto, com parasitemias menores, a sensibilidade diminui drasticamente, sendo inferior a 60% nos casos de parasitemia igual ou inferior a 10%. Pela sua praticidade e facilidade de realização, tanto o *Para*Sight-*F*® como o ICT Malaria *Pf*® têm sido considerados testes úteis para a triagem e mesmo para a confirmação diagnóstica, principalmente em situações onde é complicado processar o exame da gota espessa, como áreas de difícil acesso, ou em situações de baixa parasitemia. No entanto, PfHRP2 só é produzida para o *P. falciparum*, não sendo possível, portanto, diagnosticar outras espécies de plasmódios com esses testes. Isto representa um inconveniente para a nossa realidade, já que o *P. vivax* é a espécie mais prevalente no Brasil[1,7].

ICT Malaria Pf/Pv® e OptiMAL® (Flow Inc., EUA)

Mais recentemente, outros métodos de diagnóstico rápido foram desenvolvidos, tendo a vantagem de se poder capturar antígenos de *P. falciparum*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

e *P. vivax*, simultaneamente. Tratam-se do ICT Malaria Pf/Pv®, do *Para*Sight-*F+V* e do OpitMAL®, testes também baseados em fitas de detecção por imunocromatografia, os quais utilizam anticorpos policlonais e monoclonais marcados com ouro e dirigidos contra a enzima lactato desidrogenase, específica do parasito (pDHL), presente no sangue total do paciente. Esta é uma enzima intracelular produzida em abundância pelos parasitos vivos, o que permite diferenciar entre fase aguda e convalescença da infecção. Apesar de promissores, estes testes ainda não são comercializados em nosso meio e poucos estudos de campo foram feitos até o momento para determinar sua efetividade no diagnóstico da malária[2,8].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Avila SLM, Ferreira AW. Malaria diagnosis: a review. Braz J Med Biol Res, 29:431-443, 1996.
2. Cooke AH, Chiodini PL, Doherty T et al. Comparison of a parasite lactate dehydrogenase-based immunochromatographic antigen detection assay (OptiMAL) with microscopy for the detection of malaria parasites in human blood samples. Am J Trop Med Hyg, 60:173-76, 1999.
3. Gilles HM, Warrel DA. Bruce-Chwatt's Essential Malariology. London: Edward Arnold, 1993.
4. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Terapêutica da Malária. Brasília (DF), 1996.
5. Organizacion Panamericana de la Salud. Organizacion Mundial de la Salud. Diagnóstico de Malaria. Publicación Científica 512.Washington (DC), 1988.
6. Petersen E, Marbiah NT. QBC® and thick blood films for malaria diagnosis under field conditions. Trans R Soc Trop Med Hyg, 88:416-17, 1994.
7. Pieroni P, Mills CD, Ohrt C et al. Comparison of the ParaSight-F test and the ICT Malaria Pf test with the polymerase chain reaction for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travellers. Trans R Soc Trop Med Hyg, 92:166-69, 1998.
8. Tjitra E, Suprianto S, Dyer M et al. Field evaluation of the ICT malaria P.f/P.v immunochromatographic test for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in patients with a presumptive clinical diagnosis of malaria in eastern Indonesia. J Clin Microbio, 37:2412-17, 1999.
9. White NJ. Malaria. In: Cook GC ed. Manson's Tropical Diseases. London: WB Saunder, 1087-1164, 1996.
10. Wilcox A. Blood films in malaria. Trop Med News, 1:19, 1944.
11. Wilcox A. Manual for the microscopical diagnosis of malaria in man. Washington (DC): US Department of Health, Education and Welfare,1960.
12. World Health Organization. Malaria diagnosis. Bull WHO, 66:575-94, 1988.
13. Wyler DJ. *Plasmodium* species (Malaria). In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 3th ed. New York: Churchill Livingstone, 2056-2066, 1990.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Capítulo 16



Babesiose Humana*

Philippe Brasseur

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A babesiose humana é uma infecção devida à invasão das hemácias por protozoários parasitos transmitidos por carrapatos. As duas espécies *Babesia microti* e *Babesia divergens* são responsáveis pela maioria das infecções reportadas. Mais de 200 casos por *B. microti* foram descritos na costa nordeste dos EUA[12], enquanto na Europa foram documentados 29 casos, dos quais 83% ocorreram em pacientes que sofreram extirpação do baço. A maioria dessas infecções foi atribuída a *B. divergens*. A infecção lembra a malária, com diagnóstico difícil e com sintomas clínicos semelhantes. A identificação rápida do parasito é de extrema importância para prevenir complicações severas como hemólise e insuficiência renal. Recentemente, infecções relacionadas a organismos tipo *Babesia* WA1, que ocorreram em pacientes esplenectomizados, foram descritas no norte da Califórnia[8], no Estado de Washington[5,9] e no Missouri[4].

MÉTODOS PARASITOLÓGICOS

Exame Microscópico

O diagnóstico da babesiose humana baseia-se na presença

*Traduzido do Inglês por Geraldo Attilio De Carli e Edmundo Carlos Grisard.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

de parasitos dentro das hemácias, os quais são detectados pelo exame microscópico do sangue periférico em esfregaços sangüíneos corados pelo método de Giemsa. As hemácias são infectadas por parasitos com pleomorfismo múltiplo (1-3μm), geralmente de dois a quatro organismos. Merozoítos extracelulares podem ser detectados. A babesia é caracterizada por não acumular pigmento no citoplasma.

Os gametócitos não são identificados pela coloração de Giemsa. Nas infecções pela *B. divergens* são observados parasitos intra-eritrocitários na posição central ou subcentral com aparência puntiforme, anular ou filamentosa (Fig. 16.1).

Os parasitos piriformes são freqüentemente vistos aos pares ligados através de suas pequenas extremidades ou, mais raramente, como a forma de "cruz de malta". A parasitemia apresenta índices altos (1 a 80%) na maioria dos casos.

Nas infecções pela *B. microti*, os parasitos intracelulares apresentam a forma em "anel" e de "cesta", mas as formas de "cruz de malta" são raramente vistas e não são consideradas específicas para essa espécie. O grau da parasitemia é baixo.

As outras espécies, como, por exemplo, *B. bovis* ou *B. canis* são raramente encontradas nas infecções humanas. Nas infecções pela *B. bovis* são observadas formas anulares, que são menores do que as da *B. divergens* (1-2μm). A *B. canis* é caracterizada por formas bigeminadas (3-5μm). Ambas as espécies produzem somente baixos níveis de parasitemia e os parasitos estão localizados no centro das hemácias (Fig. 16.1).

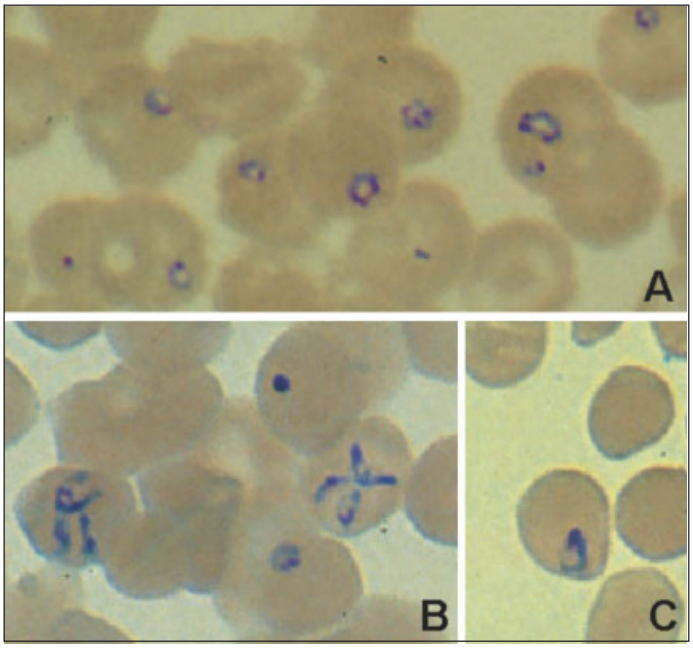


Fig. 16.1 — Babesia microti*: A) Esfregaço estirado corado pelo método de Giemsa; B, C) Infecção pela* Babesia*, esfregaço estirado corado pelo método de Giemsa; notar em (B) a tétrade ("cruz de malta"), as variações no tamanho, na forma dos estágios em anel de bacharel e a ausência de pigmento no citoplasma. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Método de Concentração

Os esfregaços espessos não são indicados para a pesquisa dos parasitos da *Babesia*, os quais são muito pequenos e não são identificados com confiança. O Q*uantitative Buffy Coat* (QBC®) foi proposto para a pesquisa da babesiose[6]. Esse método combina a concentração dos parasitos pela centrifugação do sangue em tubos de micro-hematócrito e a coloração pelo fluorocromo alaranjado de acridina. A técnica requer micro-hematócritos revestidos com alaranjado de acridina e anticoagulante, preenchidos com cerca de 50 a 60µl de sangue total e centrifugados a 15.000 x *g* por 5 minutos. Após a centrifugação, os micro-hematócritos são submetidos a epifluorescência (UV). A sensibilidade desse método é estimada entre 10^{-7} e 10^{-8}, sendo a sensibilidade maior do que o exame de esfregaços permanentes corados pelo método de Giemsa, os quais apresentam um índice de 10^{-5} a $10^{-6.}$ O método QBC® é indicado para detectar baixos níveis de parasitemia, sendo especialmente adaptado para o diagnóstico da *B. microti*, uma vez que os parasitos dessa espécie, nas infecções, são geralmente mais escassos. Não existe interesse em avaliar os altos níveis de parasitemias como nas infecções pela *B. divergens*. O principal limite do sistema QBC® é o alto custo do equipamento.

IMUNODIAGNÓSTICO

Reação da Imunofluorescência Indireta (RIFI)

A reação da imunofluorescência indireta (RIFI) foi idealizada para detectar anticorpos de *B. microti* em pacientes com babesiose[1]. O antígeno da *B. microti* é obtido de cepas mantidas em hamsters fêmeas (*Golden hamster*) através da passagem mensal contínua pela inoculação intraperitoneal. Quando a parasitemia atinge 40% de eritrócitos infectados, os animais são anestesiados e o sangue colhido com seringa heparinizada através de punção cardíaca. O sangue é centrifugado (500 x *g* por 5 min), o plasma desprezado e as hemácias lavadas em três ciclos de centrifugação, com 10ml de solução salina tamponada (PBS), estéril e pH 7,6. Os eritrócitos são ressuspendidos em PBS para obter uma concentração de um a quatro parasitos por eritrócito, por campo, em esfregaço espesso.

O antígeno da *B. divergens* é preparado pela cultura contínua *in vitro* do parasito (cepa Rouen, 1987) em eritrócitos humanos[3]. O antígeno pode também ser preparado pela inoculação intraperitonial de gerbils com eritrócitos humanos parasitados. A punção cardíaca é realizada quando a parasitemia atinge 50% (3-4 dias após a inoculação).

Na babesiose aguda os títulos excedem a diluição de 1:2.056; entretanto, esses títulos sofrem um declínio dentro de seis a 12 meses após o tratamento do paciente. Existe uma fraca correlação entre o título dos anticorpos e a severidade dos sintomas[11]. O título dos anticorpos é negativo nos estágios precoces da doença, os quais não podem ser detectados na primeira semana da doença.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

A RIFI não é indicada para o diagnóstico de urgência, mas para a confirmação do diagnóstico. Em áreas endêmicas a sorologia não discrimina entre a exposição e a pessoa realmente infectada. Na babesiose pela *B. divergens* os títulos de anticorpos são altos quando são usados antígenos de *B. canis* em detrimento aos homólogos, especialmente nos estágios recentes da infecção. Não existe evidências da troca de epítopo entre antígenos em diluições baixas da *B. microti*, *B. equi*, *B. caballi e Plasmodium falciparum*[9]. Os soros de pacientes infectados com o organismo tipo *Babesia* WA1 e *B. microti* não apresentam reações cruzadas.

MÉTODOS MOLECULARES

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação *in vitro* de seqüências específicas de DNA de *B. microti* tem sido utilizada para o diagnóstico rápido e sensível da babesiose humana[7]. Foi descrito um fragmento específico de um gene de 589pb codificante para a subunidade menor do RNA ribossômico (ssu-rRNA), o qual permite a diferenciação entre *B. microti* e *B. gibsoni*. Iniciadores específicos baseados na seqüência deste gene têm sido utilizados na PCR para identificação específica.

A aplicação da análise por PCR permite a detecção da presença do parasito tão cedo como 24 horas após o surgimento dos sintomas, permanecendo positivo por mais de dois meses. O nível de sensibilidade dessa reação é estimado em três merozoítos por amostra. Em um estudo comparativo, a PCR apresentou-se mais sensível e tão específica quanto a inoculação em hamsters. Da mesma forma, a PCR apresentou-se tão específica e sensível quanto o exame de esfregaços sangüíneos em pacientes com babesiose recente.

INOCULAÇÃO EM ANIMAIS

Em muitos casos a inoculação de animais é requerida, desde que os aspectos morfológicos do parasito não são suficientes para a identificação da espécie. A inoculação de 0,1 a 0,5ml do sangue do paciente em fêmeas de *golden hamster* (*Mesocricetus auratus*) é muito útil para a identificação da espécie *B. microti*[2,10]. O sangue do animal deve ser examinado semanalmente para detectar os parasitos, os quais aparecem dois a quatro dias após a inoculação. O exame microscópico deve ser realizado até a sexta semana antes de considerar o teste negativo. O hamster infectado desenvolve uma severa anemia com presença de reticulócitos. A parasitemia atinge mais do que 50% e decresce gradualmente até a recuperação do animal. A inoculação do hamster pode detectar 300 parasitos por ml de sangue, mas requer várias semanas para confirmar a espécie do parasito.

Para a infecção da *B. divergens* o gerbil (*Meriones unguiculatus*) é usado como hospedeiro substituto. Um volume de 0,5ml de sangue do paciente é inoculado pela via intraperitoneal em animais com três a quatro me-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

ses de idade. A infeção desenvolve-se com rapidez e o sangue é diariamente colhido da veia da cauda para detectar os parasitos. Em contraste com a localização periférica do parasito observado no sangue de bovinos, nos eritrócitos do gerbil o parasito localiza-se na posição central. Os pequenos animais desenvolvem uma alta parasitemia (60% a 80%) e morrem em três a seis dias.

OUTROS RESULTADOS DE LABORATÓRIO

Em acréscimo ao diagnóstico específico da babesiose humana, outros achados de laboratório podem ser de valia. Devido à freqüente anemia hemolítica, especialmente na infecção pela *B. divergens*, é observada uma diminuição dos eritrócitos e da contagem dos trombócitos, da hemoglobina, do hematócrito e nos níveis de hepatoglobulinemia. Em contraste há um aumento da contagem dos reticulócitos, da bilirrubinemia direta e da lactato desidrogenase. Em relação à função renal, as anormalidades incluem o aumento da uréia e da creatinina sangüínea.

CONCLUSÕES

A coloração de esfregaços sangüíneos pelo método de Giemsa é sensível e específica, sendo indicada para o diagnóstico da *B. divergens* e da infeção aguda pela *B. microti*. A amplificação pela PCR deve ser usada para o diagnóstico precoce, especialmente quando o sangue examinado permanece negativo e existe suspeita de babesiose clínica. A inoculação em animais e a RIFI não são indicadas para o diagnóstico precoce. A inoculação de animais é limitada pela avaliação das espécies de *Babesia* e pela suspeita prévia pelo exame microscópico. A RIFI é útil somente para confirmar o diagnóstico ou para detectar portadores assintomáticos, mas para esse propósito, a PCR aparece como o procedimento mais sensível e mais prático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chisholm ES, Ruebush TK II, Sulzer AJ et al. *Babesia microti* infection in man: evaluation of an indirect immunofluorescent antibody test. Am J Trop Med Hyg, 27:14-1919, 1978.
2. Gleason NN, Healy GR, Western KA et al. The gray strain of *Babesia microti* from a human case established in laboratory animals. J Parasitol, 56:1256-1257, 1970.
3. Gorenflot A, Brasseur P, Precigout E et al. Cytological and immunological responses to *Babesia divergens* in different hosts: ox, gerbil, man. Parasitol Res, 77:3-12, 1991.
4. Herwaldt BL, Persing DH, Precigout E et al. A fatal case of babesiosis in Missouri: identification of another piroplasm that infects humans. Ann Intern Med, 124:643-650, 1996.
5. Herwaldt BL, Kjemtrup AM, Conrad PA et al. Transfusion-transmission babesiosis in Washington State: first reported case caused by WA_1-type parasite. J Infect Dis, 175:1259-1962, 1997.
6. Mattia AR, Waldron MA, Sierra LS. Use of the quantitative buffy coat system for detection of parasitemia in patients with babesiosis. J Clin Microbiol, 31:2816-2818, 1993.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

7. Persing DH, Mathiesen D, Marshall WF et al. Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol, 30:2097-2103, 1992.

8. Persing DH, Herwaldt BL, Glaser C et al. Infection with a *Babesia*-like organism in Northern California. N Engl J Med, 332:298-303, 1995.

9. Quick RE, Herwaldt BL, Thomford JW et al. Babesiosis in Washington State: a new species of *Babesia*. Ann Intern Med, 119:284-290, 1993.

10. Roth EF, Tanowittz H, Wittner M et al. *Babesia microti*: biochemistry and function of hamster erythrocytes infected from human source. Exp Parasitol, 51:116-120, 1981.

11. Ruebush TK II, Chisholm ES, Sulzer AJ et al. Development and persistance of antibody in persons infected wit *Babesia microti*. Am J Trop Med Hyg, 30:291-292, 1981.

12. Telford III SR, Gorenflot A, Brasseur P et al. Babasial infections in human and wildlife. In: Kreier JP ed. Parasitic Protozoa. San Diego: Academic Press, v. 5, 1993.

© *Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.*

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Capítulo 17



Angiostrongilíase Abdominal

Carlos Graeff-Teixeira

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A família Angiostrongylidae inclui nematóides que se localizam no interior dos vasos arteriais[11]. Duas espécies são importantes na Parasitologia humana: *Angiostrongylus cantonensis* e *A. costaricensis*. O *A. cantonensis* ocorre na Ásia e nas ilhas do Pacífico, provocando meningoencefalite com eosinofilia no líquor pela passagem das larvas pelo sistema nervoso[4]. O *A. costaricensis* ocorre nas Américas e os vermes adultos se localizam nas artérias mesentéricas[8]. A angiostrongilíase abdominal é uma enfermidade parasitária causada por um pequeno nematóide, *Angiostrongylus costaricensis* Moreira e Cépodes, 1971.

O macho mede 20mm de comprimento. O corpo é filiforme com a extremidade caudal levemente encurvada, terminando em uma bolsa copuladora pouco desenvolvida com dois espículos. A fêmea mede 33mm de comprimento, o corpo é filiforme com a extremidade cefálica arredondada e cauda cônica. A boca tem três pequenos lábios, o ânus e a vulva estão localizados ventralmente na extremidade caudal. No hospedeiro definitivo, roedores silvestres (no sul do Brasil o mais comum é o *Oryzomys nigripes*), os vermes adultos vivem dentro das artérias mesentéricas da região ileocecal[2]. A ovoposição ocorre dentro dos vasos arteriais e os ovos embrionam enquanto transitam pelos vasos e pelos tecidos da

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

parede intestinal. Os ovos podem ser visualizados nas biópsias do intestino, medindo cerca de 90μm, com um envoltório muito delgado e um espaço claro em torno dos blastômeros ou da larva plenamente formada[7]. O encontro dos ovos embrionados desse parasito na parede dos intestinos, no tecido hepático e dentro dos pequenos vasos permite a identificação da infecção por *A. costaricensis*[6]. Esses estágios de diagnóstico não apresentam opérculo, como os ovos dos trematódeos, que são menores e sem a presença do espinho (espículo), como os ovos do gênero *Schistosoma*.

Uma vez formadas, as larvas de primeiro estádio (L1) migram até a luz do intestino e chegam ao solo com as fezes dos roedores. O hospedeiro intermediário molusco (lesmas, geralmente da família Veronicellidae) se infecta ao ingerir o material fecal dos roedores. No molusco se realizam duas mudas, amadurecendo após 18 dias as larvas de terceiro estádio (L3), que são infectantes para os mamíferos. Essas larvas podem permanecer vivas nas lesmas por vários meses ou podem sair com a secreção mucosa do molusco. Os hospedeiros definitivos ingerem as larvas de terceiro estádio (L3) contidas no tecido fibromuscular dos moluscos[9].

Os modos de transmissão para o homem não estão comprovados, mas pode ocorrer a contaminação através de verduras ou frutas com o muco dos moluscos infectados ou os próprios moluscos podem ser ingeridos inadvertidamente em meio às verduras ou propositadamente como parte da alimentação (*escargot*) ou por crianças pequenas na fase oral. Existem relatos do uso de lesmas como isca em pescaria, o que certamente constitui um grande risco de infecção. O homem é um hospedeiro acidental e pode desenvolver a doença, caracterizada por febre e dor abdominal[5]. Os produtos de secreção-excreção dos vermes adultos produzem uma intensa reação inflamatória eosinofílica na parede do intestino, no mesentério e nos linfonodos. Quando os vermes morrem induzem à trombose e oclusão arterial com infartos intestinais segmentares. As principais complicações são a oclusão intestinal por massa inflamatória, que pode ser palpável no exame do doente e a perfuração dos intestinos com peritonite e sepse. Não há tratamento medicamentoso eficaz e o tratamento cirúrgico é necessário quando aparecem as complicações. Acredita-se que os vermes não permaneçam vivos por muito tempo e em muitos casos de infecção provavelmente ocorra cura espontânea.

A parasitose ocorre nas Américas, desde o sul dos Estados Unidos da América do Norte (EUA) até o norte da Argentina e do Estado do Rio Grande do Sul, no Brasil[10]. No sul do Brasil são realizados de três a seis diagnósticos definitivos por ano, sendo a maioria dos casos originários de áreas de relevo acidentado do norte do Rio Grande do Sul, oeste de Santa Catarina e sudoeste do Paraná. As crianças, como os adultos, podem adquirir a parasitose, que apresenta uma sazonalidade associada aos períodos de temperatura mais amena na primavera, verão e outono[2].

DIAGNÓSTICO DE LABORATÓRIO

Nos roedores infectados, as larvas de primeiro estádio são facilmente identificadas nas fezes. Entretanto, o mesmo não ocorre com o homem, no

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

qual o diagnóstico depende do exame anatomopatológico de biópsias ou peças cirúrgicas e do imunodiagnóstico.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Exame Anatomopatológico

O diagnóstico definitivo é feito pelo exame anatomopatológico de biópsias ou peças cirúrgicas, quando evidenciam-se cortes de nematóides (cutícula, tubos reprodutores e um tubo reprodutivo) dentro dos vasos arteriais ou ovos dentro de pequenos vasos[1,3]. Os achados histopatológicos de intenso infiltrado eosinofílico, vasculite eosinofílica e granuloma são úteis para o patologista estabelecer a suspeita de angiostrongilíase abdominal. No leucograma poderá existir eosinofilia de até 90%, embora a contagem normal dos eosinófilos no sangue periférico não exclua o diagnóstico.

Imunodiagnóstico

Como em outras parasitoses teciduais, nas angiostrongilíases o emprego de testes imunológicos são necessários para compor o diagnóstico presuntivo. Detecção de anticorpos vem sendo realizada há anos na Costa Rica pelo Prof. Pedro Morera, como o teste de aglutinação com partículas de látex, empregando antígeno bruto, não padronizado, de vermes adultos. No Laboratório de Parasitologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS está sendo avaliado um teste imunoenzimático (ELISA), o qual emprega antígeno bruto de vermes fêmeas e a detecção de IgG. A mais recente avaliação mostrou sensibilidade de 76% e especificidade de 98% e capacidade de discriminar 100% dos casos na fase aguda da infecção. Novas preparações antigênicas têm sido buscadas, inclusive através de clonagem molecular. Estudos de sistemas para a detecção da resposta humoral a nível de isotipos, como IgG4, estão sendo pesquisados. A subclasse IgE não apresenta resposta específica em intensidade significativa, como poderia se esperar nas helmintíases. Esses mesmos procedimentos podem auxiliar na identificação de casos de meningites eosinofílicas determinadas pelo *A. cantonensis* em indivíduos que viajam para áreas endêmicas de angiostrongilíase cerebral (Ásia, Ilhas do Pacífico e Ilhas do Caribe).

Métodos Moleculares

A detecção de ácidos nucléicos no sangue periférico amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), está sendo desenvolvida, podendo vir a complementar o imunodiagnóstico.

Exame Parasitológico das Fezes

O exame parasitológico das fezes para a pesquisa de larvas não tem utilidade na infecção humana. As larvas ficam retidas nos tecidos e existem poucas evidências de que esses organismos saiam com as fezes. En-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

tretanto, seria recomendável verificar o isolamento de larvas através do método de Baermann em casos suspeitos ou com o diagnóstico histopatológico.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agostini AA, Marcolan AM, Lisot JMC et al. Angiostrongilíase abdominal. Estudo anátomo-patológico de quatro casos observados no Rio Grande do Sul, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 79:443-445, 1984.
2. Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Lenzi HL. Clinical and epidemiological aspects of abdominal angistrongyliasis in southern Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo, 33:375-380, 1991.
3. Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Lenzi HL. Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiotrongyliais. Parasitol Res, 77:606-611, 1991.
4. Koo J, Pien F, Kliks, Michael M. *Angiostrongylus (Parastrongylus)* Eosinophilic Meningitis. Rev Infec Dis, 10:1155-1160, 1988.
5. Loria-CR, Lobo-Sanahuja JF Clinical abdominal angiostrongylosis. A study of 116 children with intestinal eosinophilic granuloma caused by *Angiostrongylus costaricensis*. Am J Trop Med Hyg, 9:538-544, 1980.
6. Mentz JP, Dalvesco JÁ, Agostini AA et al. Manifestações de comprometimento hepático na angiostrongilíase abdominal e diagnóstico pelo encontro dos ovos do parasita. Rev AMRIGS (Porto Alegre), 37:289-290, 1993.
7. Morera, P. Granulomas entéricos y linfáticos com intensa eosinofilia isular producidos por un estrongilideo (Strongylata; Railliet y Henry, 1913). II — Aspecto Parasitologico (nota previa). Acta Medica Costaricense, 10:257-265, 1967.
8. Morera P. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971. Am J Trop Med Hyg, 22:613-21, 1973.
9. Mota EM, Lenzi HL. *Angiostrongylus costaricensis* life cycle: a new proposal. Mem Inst Oswaldo Cruz, 90:707-709, 1995.
10. Pena GPM, Andrade Filho JS, Assis SC. *Angiostrongylus costaricensis*: first record of its occurrence in the state of Espírito Santo, Brazil, and a review of its geographic distribution. Rev Inst Med Trop São Paulo, 37:369-374, 1995.
11. Ubelaker JE Systematics of species referred to the genus *Angiostrongylus*. J Parasitology, 72:237-244, 1986.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Capítulo 18



Filarioses

Geraldo Attilio De Carli
Tiana Tasca

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Existem aproximadamente 200 espécies de filárias, embora apenas algumas sejam patogênicas. No Brasil, somente três espécies são encontradas parasitando o homem: a *Wuchereria bancrofti*, a *Onchocerca volvulus* e a *Mansonella ozzardi*; entretanto, *a Mansonella perstans* foi descrita na Amazônia. O diagnóstico definitivo das filárias *W. bancrofti* (patogênica) e *M. ozzardi* (patogenicidade discutida) depende da demonstração do estádio embrionário desses vermes (microfilárias) no sangue periférico. As microfilárias (Mf) da *O. volvulus* são detectadas no tecido celular subcutâneo, embora elas possam ser ocasionalmente encontradas no sangue circulante. Os estádios embrionários da *W. bancrofti* são também revelados no líquido da hidrocele e na urina, particularmente nos pacientes que apresentam uma alta parasitemia ou que tenham sido tratados recentemente com dietilcarbamazina (DEC). O horário ideal para a colheita do sangue periférico para detectar as infecções periódicas é entre 22 e quatro horas, ao passo que nas infecções não-periódicas o sangue circulante pode ser colhido durante as 24 horas, apesar do pico da parasitemia ocorrer ao entardecer. Dependendo das espécies, esses vermes apresentam periodicidade na circulação. Conseqüentemente, deve ser observado, antes da colheita do sangue, o tipo de periodicidade característica da espécie da filária presente na área onde o paciente possa ter adquirido a infecção. As larvas da *W. bancrofti*, *Brugia malayi*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

e *Brugia timori* apresentam usualmente uma periodicidade noturna. Isso significa que as microfilárias podem ser encontradas no sangue periférico em pequeno número durante o dia, mas em níveis altos durante a noite. *M. ozzardi* e *O. volvulus* não são periódicas, mas tendem a ser mais numerosas durante a noite[2,15,22].

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA FILARIOSE

A confirmação das infecções por filárias é baseada na detecção de microfilárias no sangue e nos tecidos. As microfilárias podem ser identificadas ao nível de espécie, tomando como base a presença ou ausência da bainha e a posição dos núcleos do corpo em preparações coradas. As microfilárias são demonstradas por meio de diversos métodos e técnicas: a) exame a fresco do sangue para a pesquisa de organismos móveis; b) pesquisa das microfilárias em esfregaços sangüíneos espessos e corados, e c) métodos e técnicas de concentração. A probabilidade do encontro dos parasitos aumenta com o número de lâminas examinadas de um mesmo paciente. O diagnóstico presuntivo da filariose, infecção ou doença causada pela presença no organismo humano de helmintos nematóides da superfamília Filarioidea, deve incluir linfangite (infecção dos vasos linfáticos) e linfedema (obstrução adquirida das vias linfáticas), geralmente por filárias dos gêneros *Wuchereria* e *Brugia*. O diagnóstico definitivo é realizado pela detecção de microfilárias da *W. bancrofti*[13,21], *B. malayi*[18], *Loa loa*[20], *M. ozzardi*[20] e *M. perstans*[20] no sangue periférico. As microfilárias da *O. volvulus* e *M. streptocerca* são primariamente encontradas parasitando o tecido subcutâneo, apesar de serem ocasionalmente detectadas no sangue. O exame do esfregaço sangüíneo para a pesquisa de microfilárias deve incluir uma exaustiva revisão de toda a preparação. As microfilárias embainhadas freqüentemente perdem a bainha quando o esfregaço espesso seca. Outros procedimentos são indicados para o diagnóstico e a identificação das microfilárias como: teste com dietilcarbamazina (DEC); testes sorológicos; detecção de antígenos circulantes de filária; e, para os vermes adultos, ultra-sonografia.

FILARIOSE PELA *WUCHERERIA BANCROFTI*

Ver Capítulo 19 — Diagnóstico Laboratorial da Filariose Bancroftiana.

FILARIOSE PELA *MANSONELLA OZZARDI*

O diagnóstico da infecção por *Mansonella ozzardi* depende da presença das microfilárias no sangue periférico. A técnica de Knott é indicada para concentração dos parasitos. O sangue obtido do lóbulo da orelha apresenta maior densidade de microfilárias do que o sangue obtido por punção digital. O exame de fragmentos de pele ou biópsia também pode demonstrar microfilárias em alguns casos, mas estas técnicas são menos sensíveis do que o exame de esfregaços de sangue periférico[2,22].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

FILARIOSE PELA *ONCHOCERCA VOLVULUS*

O diagnóstico da oncocercose é estabelecido por meio de exame histológico da pele, dos nódulos cutâneos, dos linfonodos ou dos olhos. As microfilárias podem ser raramente isoladas na pele e com freqüência na conjuntiva[14,22].

A excisão cirúrgica dos nódulos é indicada para o diagnóstico e apresenta benefício terapêutico. Aspirado de nódulo ou sangue e linfa pode ser examinado para detecção das microfilárias. O parasito é raramente diagnosticado no sangue periférico afastado do local da lesão[22]. Algumas vezes o parasito é encontrado na urina, provavelmente devido à presença de vermes adultos na região pélvica. O parasito é identificado ocasionalmente no escarro e no fluido cerebroespinhal[22].

Nas infecções por O. *volvulus* a biópsia cutânea (retalho cutâneo) é o melhor método para a pesquisa e identificação das microfilárias[2]. Quando o parasito não pode ser demonstrado pelos métodos convencionais é utilizado o teste de Mazzotti. O teste consiste na administração ao paciente, por via oral, de 50mg de dietilcarbamazina (DEC). Aguardar algumas horas e verificar o aparecimento de prurido, edema e dermatite que indicam o diagnóstico da oncocercose. O teste é indicado para o diagnóstico das infecções inaparentes e assintomáticas.

Os testes sorológicos estão ainda em fase de padronização, não existem técnicas com boa sensibilidade e especificidade para o diagnóstico. Os resultados da reação em cadeia da polimerase (PCR), comparados com o exame dos fragmentos de pele, demonstraram que em 60 pacientes com teste do fragmento de pele positivo para a presença de microfilárias foi positivo também para o teste da PCR, enquanto 13 dos 34 pacientes com resultado negativo para o exame do fragmento de pele positivaram a reação da PCR[22]. Quando biópsias de pele são digeridas pela colagenase para a detecção de microfilárias, a sensibilidade (78,9%) é comparável à da PCR (76,2%)[22]. A PCR é mais sensível do que os exames de fragmentos de pele e um resultado de PCR positivo prediz recrudescência da doença[22].

EXAME A FRESCO DO SANGUE

Colher o sangue da polpa digital e pesquisar ao microscópio, entre lâmina e lamínula, a presença de organismos vivos. Nesse método as hemácias poderão ser rompidas pela adição de igual volume de água destilada ou solução aquosa de saponina a 2% (m/v).

Esfregaços Sangüíneos Espessos e Corados

Esse método é indicado, principalmente, para inquéritos epidemiológicos em zonas endêmicas. O procedimento possibilita também o envio de amostras para exames em laboratórios centrais, para a confirmação do diagnóstico. Os esfregaços corados revelam estruturas morfológicas, por meio das quais é realizada a diferenciação das espécies; enquanto nas preparações

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

não-coradas de microfilárias não são suficientemente evidenciados os detalhes morfológicos, que permitem a identificação das espécies. A coloração de Giemsa (ver p. 296) e as colorações da hematoxilina de Bohmer (ver p. 366) e de Delafield (ver p. 360) são os processos indicados para a coloração e diagnóstico dessas formas embrionárias[9].

Preparação

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Deixar as lâminas mergulhadas na solução de limpeza ou em detergente durante 24 horas; após, lavar em água corrente para remover os resíduos da solução de limpeza ou do detergente, enxaguar em água destilada e em solução de álcool etílico a 95%. Deixar secar à temperatura ambiente protegidas da poeira. Qualquer resíduo que sobrar após a limpeza pode causar a flutuação ou o descolamento do esfregaço durante o tratamento subseqüente.

3. Com pipeta automática ou graduada colocar em lâmina de microscopia, perto de uma das extremidades, quatro gotas ou quantidade medida de sangue fresco, colhido por punção venosa ou da polpa digital. Com a ponta de outra lâmina, preparar um esfregaço retangular. Quando forem usados 40 a 30µl de sangue o esfregaço deverá ter a área aproximada de 20 x 25mm. Nos esfregaços muito pequenos e, portanto, muito espessos, as microfilárias tendem a se desprenderem durante o procedimento ulterior de desemoglobinização e de coloração. Os esfregaços grandes apresentam melhores resultados do que as preparações pequenas, apesar do exame ser mais demorado.

4. Deixar secar à temperatura ambiente e, após, imergir a preparação em água corrente ou em solução salina a 0,85% para produzir a desemoglobinização. *Usar cubas de Coplin nesta fase da preparação. Não espalhar água sobre o esfregaço*. Remover o esfregaço e secar à temperatura ambiente na posição vertical. Quando seco, imergir em metanol por dois segundos[9]. *Usar cubas de Coplin nesta fase da preparação*. Essa etapa fixa o esfregaço, atuando como mordente e permitindo uma boa coloração. Os esfregaços devem ser armazenados e/ou corados pelos métodos de Giemsa (ver p. 296), hematoxilina de Delafield (ver p. 360) e/ou de Mayer (ver p. 364)

Observações

1. Proteger a preparação contra a poeira e os insetos, com gaze ou com a tampa de placa de Petri. A poeira poderá trazer confusões quando o esfregaço for corado.

2. As preparações tornam-se muito difíceis de serem desemoglobinizadas quando os esfregaços secarem durante um período maior do que 24 horas. A desemoglobinização do esfregaço é um procedimento crítico. As hemácias lisadas podem ser vistas soltas na água e todo o processo não deve durar mais do que um a dois minutos. Quando os esfregaços perma-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

necerem na água durante um tempo maior, as filárias poderão soltar-se da preparação.

Método da Contagem em Câmara

Vários métodos de contagem das microfilárias têm sido descritos na literatura. Esses métodos dependem da preparação dos esfregaços permanentes corados ou do exame direto a fresco. A identificação das microfilárias torna-se fácil quando a coloração usada está correta[9,11].

Procedimento

1. Com lápis de diamante marcar em lâmina de microscopia de 76 x 25mm linhas separadas de aproximadamente 2mm de distanciamento. Preparar um pequeno reservatório de aproximadamente 20 x 30mm com tiras de vidro (cortadas de outra lâmina) e fixadas à lâmina com DPX, bálsamo do Canadá, ou outra resina sintética. Quando a substância glutinosa estiver seca a lâmina está pronta para o uso[9,11].

2. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

3. Colher sangue da polpa digital ou do lóbulo da orelha. Usar na rotina aproximadamente 20 a 100µl de sangue medido com pipeta automática.

4. Quando forem colocados na câmara 100µl de sangue, usar câmara maior (20 x 45mm), devido à intensa coloração vermelha da hemoglobina.

5. O volume medido de sangue é descarregado em um pequeno volume de água previamente colocado na câmara de contagem. Adicionar água suficiente até que a câmara esteja cheia. Impedir a formação de menisco côncavo, o qual poderá tornar obscuras as microfilárias situadas nas bordas da lâmina. A câmara não deve transbordar para evitar a formação de menisco convexo. Não usar lamínula.

6. As microfilárias são observadas com o aumento de 30 a 40X. Contar as filárias usando as linhas feitas na lâmina.

7. Algumas microfilárias morrem rapidamente na água, outras vivem por um longo período, por exemplo: a *W. bancrofti*, *B. malayi* e *L. Loa* permanecem vivas, enquanto a *Dirofilária immitis* morre.

8. Quando a lâmina não pode ser examinada imediatamente após a colheita, misturar o sangue com 0,5 a 1ml de ácido acético. O sangue hemolisado pode ser armazenado e examinado após vários meses.

MÉTODOS DE COLORAÇÃO

Coloração de Giemsa

Ver página 296 — Reagentes, Preparação do Corante, Solução tampão de fosfatos, Coloração da Amostra e Controle de Qualidade.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Características da Coloração

As microfilárias coradas pelo método de Giemsa mostram as células excretora e a embrionária coradas em azul-celeste, os poros excretor e anal corados em rosa-avermelhado e a bainha, se presente, em rosa-claro[2,3,4,15,16].

Coloração pela Hematoxilina de Delafield

As microfilárias em preparações não-coradas não mostram completamente as características morfológicas para permitir a identificação positiva do parasito. Apesar do método de Giemsa ser usado na rotina de coloração dos parasitos do sangue, o procedimento da hematoxilina de Delafield é mais empregado na demonstração dos detalhes estruturais das microfilárias. O corante realça, especialmente, quando presente, os núcleos e a bainha. Nenhum corante, entretanto, revela todas as características morfológicas e em muitos casos mais de um procedimento de coloração pode ser necessário para a identificação das espécies. Esfregaços sangüíneos espessos (gota espessa) ou esfregaços estirados, preparados com sangue concentrado corados pela hematoxilina de Delafield, são usados para o diagnóstico dos estádios embrionários das filárias[1,5,15,16].

Reagentes

1. Hematoxilina, forma cristalina (CI 75290-Merck) ($C_{16}H_{14}O_6$)
2. Álcool etílico absoluto (C_2H_6O), livre de acetona
3. Solução salina a 0,85% (ver p. 35)
4. Álcool metílico (CH_4O), livre de acetona
5. Glicerina ($C_3H_8O_3$)
6. Sulfato de alumínio amoniacal (alúmen de amônio) [$AlNH_4(SO_4)_2.12H_2O$]
7. Corante: hematoxilina de Delafield
8. Álcool etílico a 90%, 80% 70%, 50%, 30% (v/v)
9. Solução alcoólica de ácido clorídrico a 0,5% (v/v)
10. Solução aquosa de ácido clorídrico a 0,05% (v/v)
11. Solução aquosa de ácido clorídrico a 0,1% (v/v)
12. Solução de hidróxido de amônio (amoníaco) a 25-27% (m/v)
13. Creosoto de faia
14. Xilol (xileno) (C_8H_{10})
15. Resina sintética (*Cytoseal* 60)

Hematoxilina de Delafield segundo Ash e Orihel[2,3]

Preparação do Corante

Hematoxilina, forma cristalina	4g
Álcool etílico absoluto	25ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Solução aquosa saturada de alúmen de amônio	400ml
Glicerina	100ml
Álcool metílico	100ml

• Dissolver os cristais de hematoxilina no álcool etílico absoluto. Adicionar, lentamente, a solução saturada aquosa de sulfato de alumínio amoniacal (aproximadamente uma parte de alúmen para 11 partes de água destilada-deionizada). Deixar exposto, em um balão volumétrico, à luz solar ou a 37°C, por três a cinco dias, para que a hematoxilina se oxide à hematina. Quando a solução estiver "amadurecida" (seis semanas), filtrar em papel-filtro e adicionar a glicerina e o álcool metílico. Armazenar o corante em frasco âmbar, protegido do calor.

Preparação dos esfregaços

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Preparar os esfregaços espessos ou estirados com o sedimento de sangue concentrado. Deixar secar.

3. Para que se produza a hemólise nos esfregaços espessos, mergulhar as lâminas em solução salina a 0,85%, ou em água corrente, até que toda a hemoglobina seja removida. Não lisar as hemácias nos esfregaços estirados.

4. Fixar os esfregaços, ainda úmidos, com álcool etílico quente (60°C) por 10 a 15 minutos.

1. Coloração da Amostra segundo Amato, Boeger e Amato[1]

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.
2. Álcool etílico a 70%, 15 minutos.
3. Álcool etílico a 50%, 15 minutos.
4. Álcool etílico a 30%, 15 minutos.
5. Hematoxilina de Delafield, tempo variável.
6. Água destilada, lavagem rápida.
7. Água corrente (oxidação), 15 minutos.
8. Álcool etílico 30%, 15 minutos.
9. Álcool etílico 50%, 15 minutos.
10. Álcool etílico 70%, 15 minutos.
11. Solução alcoólica de HCl a 0,5% (diferenciação), tempo variável.
12. Álcool etílico a 70%, 15 minutos.
13. Álcool etílico a 80%, 15 minutos.
14. Álcool etílico a 90%, 5 minutos.
15. Álcool etílico absoluto (1), 15 minutos.
16. Álcool etílico absoluto (2), 15 minutos.
17. Creosoto de faia, tempo variável, até a montagem.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Coloração da Amostra segundo Ash e Orihel[2,3]

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.
2. Hematoxilina de Delafield, 10-15 minutos.
3. Água destilada, lavagem rápida.
4. Solução aquosa de HCl a 0,1% (diferenciação), um minuto.
5. Água destilada-deionizada, um minuto.
6. Água corrente + gotas de amoníaco, cinco minutos (água alcalina pH ~9,0 a 10,0).
7. Água corrente, dois minutos.
8. Álcool etílico a 50%, dois minutos.
9. Álcool etílico a 70%, dois minutos.
10. Álcool etílico a 80%, dois minutos.
11. Álcool etílico a 90%, dois minutos.
12. Álcool etílico absoluto (1), cinco minutos.
13. Álcool etílico absoluto (2), cinco minutos.
14. Xilol (1), cinco minutos.
15. Xilol (2), cinco minutos.
16. Montar com resina sintética ou bálsamo do Canadá.

Controle de Qualidade (CQ)

1. Quando possível, controlar todo o procedimento de coloração antes de usar o corante para o diagnóstico da filariose no sangue. Caso o laboratório não possua sangue humano infectado com microfilárias, usar como controle sangue canino com *Dirofilária immitis.* Essa microfilária não possui bainha, mas apresenta núcleos bem distintos. A coloração das estruturas está descrita a seguir.

2. Quando sangue positivo não está disponível para o controle, seguir com todo o cuidado o procedimento de coloração dos espécimes enviados ao diagnóstico:

a. macroscopicamente, os esfregaços apresentam coloração púrpura-azulada;

b. microscopicamente, os núcleos das microfilárias coram-se em azul ou púrpura; a bainha, se presente, em púpura-claro. O citoplasma apresenta coloração avermelhada. As células R, o poro excretor e o embrionário, quando visíveis, não diferem em coloração dos núcleos da cauda. O corpo central é visto como uma estrutura esbranquiçada.

3. Calibrar o microscópio a cada 12 meses; as objetivas e as oculares empregadas na calibração devem ser usadas em todas as medidas realizadas com o microscópio. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

4. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Observações

1. A gota espessa poderá ser preparada em uma das faces da lamínula (32 x 32mm), presa por uma de suas bordas a um pequeno pedaço de borracha de forma semicircular de 15-30mm de diâmetro por 3mm de espessura (Fig. 3.1).

2. A lamínula é encaixada em entalhe feito na face plana do suporte por meio de um bisturi fino ou com lâmina de barbear. O suporte de borracha tem por finalidade facilitar a manipulação do preparado durante os diferentes tempos de fixação e coloração, além de permitir identificar o material, mediante a gravação de número numa das faces do referido fragmento de borracha.

3. O esfregaço deve ser examinado com objetiva de pequeno aumento (10X); entretanto, as características morfológicas devem ser observadas com objetiva de 40X e 100X (óleo de imersão).

4. A idade do corante deve ter no mínimo um ano de preparação. Durante o envelhecimento, a hematoxilina de Delafield deve ficar exposta ao sol. Quando os núcleos não se coram em azul e o citoplasma em vermelho, rever o envelhecimento do corante.

5. O maior benefício dessa coloração é a melhora da visibilidade da bainha. Freqüentemente, a bainha da *W. bancrofti* não é vista pela coloração de Giemsa; entretanto, essa estrutura é facilmente observada pelo método da hematoxilina de Delafield.

6. Quando o sangue é muito velho ou não foi apropriadamente processado, a coloração final pode não revelar as características dos núcleos e da bainha.

Coloração pela Hematoxilina de Harris, segundo Mallory

Preparação do Corante

Hematoxilina, forma cristalina	1g
Álcool etílico absoluto	10ml
Sulfato de alumínio e potássio (alúmen potássico)	20g
Água destilada-deionizada	200ml
Óxido de mercúrio II	0,5g
Ácido acético glacial	3-4 gotas

• Misturar os componentes com cuidado, a reação pode ser explosiva. Dissolver a hematoxilina no álcool etílico e o alúmen potássico na água. Aquecer até a ebulição. Adicionar a solução de hematoxilina e aquecer a ebulição por 30 segundos. Adicionar o óxido de mercúrio. Esfriar rapidamente. Acrescentar três a quatro gotas de ácido acético. Armazenar em frasco âmbar com tampa esmerilhada durante um a dois meses[19].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Procedimento

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colher 1ml de sangue venoso em tubos contendo 0,1ml de citrato de sódio a 5% ou EDTA.

3. Colocar a membrana-filtrante *Nuclepore* ou *Millipore* de 25mm de diâmetro e 5mm de porosidade em porta-filtro, com adaptador para seringa. Adaptar uma agulha.

4. Com seringa de plástico de 10ml, aspirar vários mililitros de solução salina a 0,85%, misturando-a com 2 a 4ml de sangue venoso.

5. Forçar, com cuidado, a passagem da mistura através da membrana, usando pressão regular e contínua.

6. Lavar a membrana-filtrante três vezes, pela passagem de 10ml de solução salina a 0,85%.

7. Retirar a membrana-filtrante do adaptador, colocando-a sobre lâmina para microscopia.

8. Examinar para a pesquisa de microfilárias vivas.

9. Mergulhar a membrana no corante de Giemsa ou na hematoxilina de Delafield, ou, na hematoxilina de Harris. A membrana pode ser corada como os esfregaços sangüíneos estirados.

10. Deixar a membrana secar e montar em resina sintética (*Cytoseal* 60).

Controle de Qualidade (CQ)

1. Quando possível, controlar o procedimento de coloração usando sangue humano ou de canino infectado com microfilárias.

2. Quando sangue positivo não estiver disponível, seguir com todo o cuidado a técnica, testando os espécimes enviados ao diagnóstico. Examinar o sedimento com pequeno e grande aumento.

3. Calibrar o microscópio a cada 12 meses; as objetivas e as oculares empregadas na calibração devem ser usadas em todas as medidas realizadas com o microscópio. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

4. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados.

Observações: Ash e Orihel[2] mergulham a membrana-filtrante na hematoxilina de Harris durante cinco a 10 minutos, lavando-a, após, em água corrente.

Coloração pela Hematoxilina de Mayer

Reagentes

1. Hematoxilina, forma cristalina (CI 75290-Merck) ($C_{16}H_{14}O_6$)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Sulfato de alumínio amoniacal (alúmen de amônio) [$AlNH_4(SO_4)_2.12H_2O$]
3. Iodato de sódio ($NaIO_3$)
4. Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$)
5. Hidrato de cloral ($C_2H_3Cl_3O_2$)
6. Álcool etílico absoluto (C_2H_6O)
7. Toluol (Tolueno) (C_7H_8)

Preparação do Corante

Hematoxilina	1g
Iodato de sódio	0,2g
Alúmen de amônio	50g
Água destilada-deionizada	1.000g
Hidrato de cloral	50g
Ácido cítrico	1g

A hematoxilina de Mayer poder ser preparada de duas maneiras:

1. Dissolver o alúmen de amônio em água fria e juntar a hematoxilina e o iodato de sódio. Agitar vigorosamente até a completa dissolução. A solução deve apresentar a cor azul-violeta. Adicionar, imediatamente após, o hidrato de cloral e o ácido cítrico. Filtrar em papel-filtro e estocar em frasco de vidro âmbar com tampa esmerilhada ao abrigo da luz[9]. Possui validade de aproximadamente seis meses; ou

2. Dissolver o alúmen de amônio em 500ml de água destilada-deionizada, a quente (não deixar ferver), a hematoxilina em 10ml de álcool absoluto e o hidrato de cloral, o ácido cítrico e o iodato de sódio nos restantes 500ml de água destilada-deionizada. Misturar as três soluções e agitar vigorosamente até a completa dissolução. Filtrar em papel-filtro e estocar em frasco de vidro âmbar com tampa esmerilhada ao abrigo da luz. Possui validade de aproximadamente seis meses.

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.
2. Preparar e desemoglobinizar o esfregaço sangüíneo.
3. Cobrir o esfregaço com a hematoxilina de Mayer, durante 10 a 15 minutos, aquecendo a lâmina até a emissão de vapores. Não deixar o corante ferver e secar durante o processo de coloração.
4. Lavar com água corrente. Drenar.
5. Clarificar com tolueno (uma lavagem), um minuto.
6. Secar à temperatura ambiente.
7. Montar com resina sintética (*Cytoseal* 60).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Observações

1. A coloração não requer diferenciador. O fundo da preparação permanece incolor.
2. A lavagem em água corrente por mais de 10 minutos possibilita coloração estável.
3. O material de biópsia cutânea pode permanecer na hematoxilina de Mayer por várias horas.

Coloração pela Hematoxilina de Bohmer

Reagentes

1. Hematoxilina, forma cristalina (CI 75290-Merck) ($C_{16}H_{14}O_6$)
2. Sulfato de alumínio e potássio (alúmen potássico) ($AlK(SO_4)_2.12H_2O$)
3. Álcool etílico absoluto (C_2H_6O)
4. Soluções de álcool etílico a 35, 50, 70, 85, 95%
5. Ácido clorídrico concentrado (HCl)
6. Amônia (NH_3)
7. Xilol (xileno) (C_8H_{10})
8. Montar com resina sintética (*Cytoseal* 60)

Preparação das Soluções

Solução A

Hematoxilina	1g
Álcool etílico absoluto	12ml

Solução B

Alúmen de sulfato de potássio	1g
Água destilada-deionizada	240ml

Solução de Trabalho

Solução A	2 ou 3 gotas
Solução B	5ml

Observação: Deixar a solução de hematoxilina "amadurecer" até adquirir cor escura.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Solução Álcool-Ácido

Álcool etílico a 70%	100ml
Ácido clorídrico	1ml

Solução Aquosa de Amônia 1:10.000

Amônia	0,1ml
Água destilada-deionizada	1.000ml

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.
2. Preparar e desemoglobinizar o esfregaço sangüíneo.
3. Fixar com álcool absoluto por um minuto.
4. Cobrir o esfregaço com a hematoxilina de Bohmer e aquecer a lâmina até a emissão de vapores. Não deixar o corante ferver durante o processo de coloração.
5. Lavar com água destilada e drenar.
6. Diferenciar com a solução álcool-ácido, um minuto.
7. Lavar com solução aquosa de amônia, um minuto.
8. Desidratar:
   Álcool etílico a 35%, cinco minutos.
   Álcool etílico a 50%, cinco minutos.
   Álcool etílico a 70%, cinco minutos.
   Álcool etílico a 85%, cinco minutos.
   Álcool etílico a 95%, cinco minutos.
   Álcool etílico absoluto, cinco minutos.
9. Clarificar com xilol, cinco minutos.
10. Montar com resina sintética (*Cytoseal* 60)

Coloração pela Hematoxilina de Carrazzi

Ver Capítulo 20 — Diagnóstico Laboratorial da Filariose Bancroftiana

MÉTODOS E TÉCNICAS DE CONCENTRAÇÃO

Quando a densidade de microfilárias é baixa no sangue periférico, são indicadas a técnica de concentração de Knott[7,8,17] e o método de filtração do sangue em membranas de *Millipore* ou em *Nuclepore*[6,10,12] para a recuperação e identificação das formas embrionárias.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Técnica de Knott

Nessa técnica[7,17] os eritrócitos são hemolisados. Os leucócitos e as microfilárias do sangue periférico são concentrados. O sangue hemolisado oferece a vantagem de remover grande parte do sedimento e aumentar a probabilidade de que sejam encontradas as microfilárias caso elas estejam presentes em pequeno número. A grande desvantagem dessa técnica é a morte e a imobilização dos parasitos, por essa razão não são identificados pela motilidade. Quando presentes na amostra, as microfilárias são concentradas, não apresentando motilidade no exame direto a fresco. As microfilárias após a coloração pelo método de Giemsa ou pela hematoxilina de Delafield exibem características morfológicas típicas de diagnóstico[5]. A solução de formaldeído a 2%, ácido acético a 2% e saponina a 2% são usadas como agentes hemolisantes.

Amostra

Sangue total colhido com anticoagulante (EDTA, heparina ou citrato de sódio).

Reagentes

1. Solução salina de citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) a 5% (m/v), heparina ou EDTA (ver p. 318).
2. Solução de formaldeído a 2% (v/v) ou ácido acético a 2% (v/v).
3. Corantes: Giemsa (ver p. 296) ou Hematoxilina de Delafield (ver p. 360).

Técnica

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Colher 1ml de sangue venoso (total ou citratado) e o transferir diretamente para tubo de centrífuga contendo 10ml de solução de formaldeído a 2%. Agitar vigorosamente.

3. Centrifugar (300-500 x *g*/2min).

4. Decantar o líquido sobrenadante e com pipeta capilar transferir o sedimento para lâmina de microscopia. Preparar um esfregaço espesso. Deixar secar à temperatura ambiente.

5. Corar o esfregaço com o corante de Giemsa ou com a hematoxilina de Delafield.

Controle de Qualidade (CQ)

1. Verificar a calibração da centrífuga.

2. Quando possível, controlar o procedimento de coloração usando sangue humano ou de canino infectado com microfilárias embainhadas ou desembainhadas.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

3. Quando sangue positivo não estiver disponível, seguir com todo o cuidado a técnica, testando os espécimes enviados ao diagnóstico. Examinar o sedimento com pequeno e grande aumento.

4. Calibrar o microscópio a cada 12 meses; as objetivas e as oculares empregadas na calibração devem ser usadas em todas as medidas realizadas com o microscópio. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

5. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados.

Observações

1. O esfregaço espesso deverá ser examinado ao microscópio com pequeno e grande aumento antes da realização da coloração.

2. Esse procedimento é ligeiramente inferior à gota espessa, pois apresenta mais resultados negativos quando a parasitemia é pequena.

3. As características morfológicas não são visíveis antes da coloração pelo método de Giemsa ou pela hematoxilina de Delafield.

Método da Membrana-Filtrante

O método de concentração pela membrana-filtrante[6,10,12] é muito sensível porque permite o exame de pequenos volumes de sangue periférico e a recuperação absoluta das microfilárias quando presentes em infecções leves. A membrana filtrante recupera a maior parte das microfilárias; entretanto, devido ao seu tamanho pequeno, *Mansonella perstans* e *Mansonella ozzardi* não são isoladas. Foram sugeridas membranas com 3µm de porosidade para a recuperação dessas microfilárias. Ver Capítulo 19 — Diagnóstico Laboratorial da Filariose Bancroftiana.

Biópsia Cutânea

Nas infecções por *Onchocerca volvulus*, *Mansonella ozzaradi* e *Mansonella perstans*, a biópsia cutânea é o melhor método para a pesquisa e identificação das microfilárias[2].

Reagentes

1. Solução salina a 0,85%
2. Corante de Giemsa (ver p. 296)

Procedimento

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Em uma lâmina de microscopia, colocar um fragmento cutâneo (2 a 5mm) sobre uma gota de solução salina. Cobrir a preparação para prevenir a evaporação.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

3. Examinar após 30 a 60 minutos, através da objetiva do microscópio de pequeno aumento (10X) e com pequena intensidade de luz.

4. Quando as microfilárias forem encontradas (os organismos abandonam a pele), remover o fragmento cutâneo e deixar o líquido contendo as microfilárias secar, na lâmina, à temperatura ambiente.

5. Fixar a preparação e corar pelo método de Giemsa.

Observação

Esse procedimento pode ser substituído pela pesquisa de microfilárias em produto de escarificação cutânea, método de fácil execução é útil em casos de baixa parasitemia.

REFERÊNCIAS BBILIOGRÁFICAS

1. Amato JFR, Boeger WA, Amato SB. Protocolos para laboratório, coleta e processamento de parasitas de pescado. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1991.
2. Ash LR, Oriehl TC. Parasites: a guide to laboratory procedures and identification. Chicago (Ill): ASCP Press, 1991.
3. Ash LR, Oriehl TC. Atlas of human parasitology.4th ed Chicago (Ill): ASCP Press, 1997.
4. Bullock-Iacullo S. Giemsa stain. In: Insenberg HD ed. Clinical microbiology procedures handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.8.4.1-7.8.4.6, v.2, 1992.
5. Bullock-Iacullo S. Delafield's hematoxylin stain. In: Insenberg HD ed. Clinical microbiology procedures handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.8.6.1-7.8.6.4, v.2, 1992.
6. Bullock-Iacullo S. Concentration procedures: membrane filtration concentration. In: Insenberg HD ed. Clinical microbiology procedures handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.8.8.1-7.8.8.3, v.2, 1992.
7. Bullock-Iacullo S. Concentration procedures: Knott concentration. In: Insenberg HD ed. Clinical microbiology procedures handbook. Washington (DC): ASM Press, 7.8.9.1-7.8.9.3, v.2, 1992.
8. Burrows RB. Microscopic diagnosis of the parasites of man. New Haven: Yale University Press, 1965.
9. Denham DA. Microfilariae. In: Gillespie SH, Hawkey PM eds. Medical Parasitology. Oxford, England: IRL Press, 240-252, 1995.
10. Dennis DT, Kean BH. Isolation of microfilariae: report of a new method. J Parasitol 57:1146-1147, 1971.
11. Desowitz RS, Southgate BA, Mataika JU. Studies on filariasis in the pacific. 3. Comparative efficacy of the stained blood-film, countiong-chamber, and membrane-filtration techniques for the diagnosis of *Wuchereria bancrofti* microfilaremia in untreated patients in areas of low endemicity. Southeast Asian. J Trop Med Public Health 4:329-335, 1973.
12. Desowitz RS, Hitchocock JC. Hyperendemic bancroftian filariosis in the kingdom of tonga: the application of the membrane filter concentration technique to an age-stratified blood survey. Am J Trop Med Hyg 23:877-879, 1974.
13. Dreyer G, Rocha A. Filariose Bancroftiana. In: Ferreira AW, Ávila SLM eds. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. São Paulo: Guanabara Koogan, 194-200, 1996.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

14. Ferreira FSC, Rocha LA, Veronesi R et al. Filaríase. In: Veronesi R, Focaccia R eds. Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu, 1385-1404, 1996.

15. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic medical parasitology. 3nd ed. Washington (DC): ASM Press, 1997.

16. Garcia LS. Practical guide to diagnostic parasitology. Washington (DC): ASM Press, 1999.

17. Knott JA. A method for making microfilarial survey on day blood. Trans R Soc Trop Med Hyg 33:191-196, 1939.

18. Lizotti MR, Supali T, Parton F et al. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Brugia malayi* in Blood. Am J Hyg Trop Med 51:314-321, 1994.

19. Mallory FB. Pathological techniques. Philadelphia: WB Saunders Co., 1944.

20. McMahom JE, Simonsen PE. Lymohatic filariasis. In: Cook GC ed. Manson's tropical diseases. 20th ed. London: WB Saunders, 1322-1338, 1996.

21. Simonsen PE, Memnge MM, Msangeni HÁ et al. Bancroftian filariasis: the paterns of filarial-specific immunoglobulin G1 (IgG1), IgG4 and circulating antigens in an endemic community of Northeastern Tanzania. Am J Hyg Trop Med 55:690-75, 1996.

22. Sun T. Parasitic disorders. Pathology, diagnosis and management. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999.

© *Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.*

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Capítulo 19



Diagnóstico Laboratorial da Filariose Bancroftiana

Gerusa Dreyer
Patrícia Dreyer

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As filarioses compõem um grupo de doenças que acometem o homem e outros animais vertebrados e são causadas por nematóides da superfamília Filarioidea. As diversas espécies parasitam mamíferos, pássaros, répteis e anfíbios. Até o presente momento, oito espécies de filárias podem parasitar o ser humano: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *B. timori*, *Loa loa*, *Mansonella ozzardi*, *M. perstans*, *M. streptocerca* e *Onchocerca volvulus*.

A filariose bancroftiana, doença exclusiva do homem, é causada por um parasito intravascular conhecido como *W. bancrofti*, sendo transmitida por um mosquito que, na maioria das regiões do mundo, é o *Culex quinquefasciatus*, conhecido no Brasil como muriçoca e carapanã. As fêmeas adultas liberam para a circulação sangüínea os embriões ou microfilárias (Mf), que são sugados pelo vetor. Apenas o mosquito fêmea pica o hospedeiro definitivo, pela necessidade que tem de extrair da hemoglobina o ferro necessário para a formação da camada de quitina dos seus ovos. No interior dos mosquitos, após um período de 14 a 21 dias — na dependência da temperatura ambiental —, as Mf passam por duas mudas e se transformam em larvas infectantes (L3). A muriçoca, por ocasião de uma nova hematofagia, deposita as L3 na pele do indivíduo sadio e, por movimentos ativos, penetram através da solução de continuidade gerada pela picada do mosquito. Daí, via sistema linfático,

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

chegam aos linfonodos e, principalmente, aos vasos linfáticos, nos quais sofrem duas mudas e se transformam em vermes adultos (VA). Após o acasalamento, as fêmeas produzem um grande número de microfilárias, que atingem o coração direito via ducto torácico, alcançando a circulação geral. Assim, esses embriões podem ser encontrados em qualquer local vascularizado. No sistema sangüíneo periférico, as Mf são acessíveis ao vetor, por ocasião da hematofagia, reiniciando, dessa forma, o ciclo.

EPIDEMIOLOGIA

A bancroftose afeta, pelo menos, cerca de 100 milhões de pessoas, distribuídas em 73 países dos diferentes continentes[63]. A doença de Bancroft é um duro encargo social e econômico inerente aos trópicos e subtrópicos da Ásia, da África, do Pacífico Ocidental e de certas regiões das Américas. Embora a distribuição da doença pareça global, aproximadamente um terço dos indivíduos infectados reside na Índia, outro terço na África e o restante se encontra, predominantemente, na região ocidental do Pacífico e no sudeste da Ásia. As Américas representam 0,3% da prevalência global e o país de maior número de casos é o Haiti, seguido do Brasil. Em nosso país, são considerados focos de transmissão ativa o Grande Recife, em Pernambuco[38,39] e a cidade de Maceió, em Alagoas[31]. Belém do Pará, que na década de 50 era a área de maior prevalência, hoje é considerada um foco sob controle[42].

Nas áreas endêmicas, a prevalência da infecção aumenta durante a infância e tende a se estabilizar no início da fase adulta[41]. A prevalência mais alta da infecção é observada entre os indivíduos do sexo masculino e na população de 20 a 40 anos de idade[3,41,48].

CONSIDERAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas da filariose podem ser causadas tanto pelos vermes adultos quanto pelas microfilárias. É controvertida a possibilidade de existência de manifestações clínicas produzidas pela larva infectante (L3) ou pelo seu estádio larval subseqüente (L4)[13,52,56]. Enquanto os vermes adultos causam lesão primariamente no vaso linfático[34,45], as microfilárias são imputadas como responsáveis pela produção de manifestações extralinfáticas da filariose bancroftiana[28].

De uma maneira simplificada, a apresentação clínica da filariose pode ser classificada em formas agudas e crônicas. As formas agudas são produzidas pela morte do parasito adulto filarial e, dependendo da localização do verme, em linfonodo ou vaso linfático, pode provocar episódios de adenites ou linfangites, respectivamente. Esse processo é localizado e o paciente geralmente não percebe a reação ou apresenta poucas repercussões sistêmicas e localizadas. Dificilmente, a morte filarial causa linfedema agudo ou crônico ipsilateral e quando ocorre ele é reversível. O que explicaria então a etiologia do linfedema crônico da elefantíase? Recentemente, foi definido que, nas áreas endêmicas, a causa mais comum de episódios agudos é a

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

infecção secundária, causada por bactérias[26], levando ao linfedema residual. Episódios agudos repetitivos de infecção bacteriana (Fig. 19.1) levam ao linfedema crônico e, conseqüentemente, à elefantíase (Fig. 19.2).

Além do linfedema de membros inferiores e de genitália externa masculina, visto em populações nas quais a bancroftose é endêmica, a hidrocele (coleção de líquido seroso na cavidade vaginal testicular por disfunção linfática), a quilocele (coleção de linfa na cavidade vaginal testicular por ruptura de varizes linfáticas) e a quilúria (presença de linfa na urina) são provocadas pelo verme adulto e constituem as apresentações mais freqüentes da doença. As microfilárias podem causar a eosinofilia pulmonar tropical — EPT[7] e a hematúria, que é microscópica, na maioria dos casos, parecendo ocorrer somente na população adulta masculina[22].

Recomendam-se a dietilcarbamazina (DEC)*, para o tratamento individual[16,24], e a ivermectina**, para os casos persistentes de hematúria filarial, quando o tratamento com a DEC não foi eficaz na eliminação das Mf circulantes. A DEC tem ação microfilaricida e é parcialmente adulticida[46]. A ivermectina apresenta um excelente efeito microfilaricida[6], porém não provoca a morte do verme adulto[18], mesmo em doses bastante elevadas[23].

DIAGNÓSTICO DE LABORATÓRIO

O diagnóstico da doença bancroftiana se baseia, eminentemente, no diagnóstico clínico. Até o momento, não existe nenhum teste marcador de morbidade de origem filarial, mesmo nos casos de EPT. Deve-se, pois, analisar cada caso, tentando-se interligar de forma minuciosa todos os dados epidemiológicos (como a procedência do indivíduo e o seu tempo de moradia em área endêmica), clínicos, laboratoriais e de resposta terapêutica antifilarial (Tabela 19.1).



Fig. 19.1 — *Paciente apresentando episódio agudo de infecção bacteriana. A dilatação linfática produzida pelo verme adulto da* W. bancrofti *predispõe o paciente a infecções bacterianas secundárias. A lesão linfática é irreversível, mesmo após a cura parasitológica.*

*****A DEC é derivada da piperazina, distribuída no Brasil pela Fundação Nacional de Saúde e fabricada pela Farmanguinhos — Fiocruz. É apresentada em comprimidos de 50mg do sal citratado. ******A Ivemerctina já está comercializada no Brasil pela Sintofarma® com o nome de Revectina. É apresentada em comprimidos de 6mg.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Tabela 19.1
Metodologias Diagnósticas Recomendadas para os Diversos Grupos de Indivíduos Vivendo em Área Endêmica de Filariose Bancroftiana

Condição	*Possibilidade de Infecção Ativa*	*Metodologias Diagnósticas Recomendadas*				
		GE	*Concentração*	*Sorologia*	*Ultra-som*	*Teste terapêutico*
Assintomático						
Crianças	--/+	NR	Sim	Se anterior negativa	Se anterior negativa	NR
Homens (adolescentes /adultos)	+++	Sim	Se anterior negativa	Se anterior negativa	Se anterior negativa	NR
Mulheres jovens adultas	-/+	Sim	Se anterior negativa	Se anterior negativa	Se anterior negativa	NR
Idosos	-/+	Sim	Se anterior negativa	Se anterior negativa	Se anterior negativa	NR
Hematúria Filarial	++++	Sim	Se anterior negativa	Se anterior negativa	Se anterior negativa	Sim (DEC ou Iv)
Episódios Agudos						
Morte de verme adulto						
Homem	++++	Sim	Se anterior negativa	Se anterior negativa	Se anterior negativa	NR
Mulher	++++	Não	Sim	Se anterior negativa	Se anterior negativa	NR
Episódios bacterianos	-	NR	NR	Sim	NR	NR
Manifestações Crônicas						
Linfedema	-	NR	NR	Sim	NR	NR
Linfo-escroto	- /+	Sim	Se anterior negativa	Se anterior negativa	Se anterior negativa	NR
Hidrocele	-/++	Sim	Se anterior negativa	Se anterior negativa	Se anterior negativa (após esvaziamento)	NR
Quilocele	-/++	Sim	Se anterior negativa	Se anterior negativa	Se anterior negativa (após esvaziamento)	NR
Quilúria	-/+	Sim	Se anterior negativa	Se anterior negativa	Sim (se for masculino)	NR
Adenopatia	--/+	NR	Sim	Sim	Sim	NR
EPT	++++	NR	Sim	Se anterior negativa	Sim	Sim (DEC)

GE: gota-espessa; NR: Não recomendado; Concentração (técnica de Knott ou filtração); EPT: Eosinofilia Pulmonar Tropical; DEC: dietilcarbamazina; Iv: ivermectina; - mínima; --/+ pouco provável; -/+ provável; -/++ mais provável; +++ quase sempre; ++++ sempre.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte



Fig. 19.2 — *Paciente de áreas endêmicas de bancroftose, portador de elefantíase, provocada por episódios agudos repetitivos de infecção bacteriana. Geralmente, esse tipo de paciente não mais apresenta infecção ativa (ver Tabela 19.4).*

Por outro lado, o diagnóstico da infecção bancroftiana pode ser feito por várias metodologias e visa à pesquisa de microfilária e do verme adulto, de forma direta ou indireta. Veja na Tabela 19.1 a possibilidade de infecção ativa nos portadores das diversas formas clínicas.

Pesquisa de Microfilária

O sangue periférico é usado normalmente para o diagnóstico das Mf de *W. bancrofti*, mas podem também ser encontradas em aspirado de medula óssea, urinas quilosa e normal (antes e depois do tratamento de pacientes microfilarêmicos), líquido quilocélico, esfregaços de secreção vaginal contaminados com sangue e biópsia de aspiração de linfonodo.

O diagnóstico parasitólogico clássico é feito pela pesquisa da Mf em sangue periférico. A forma mais utilizada ainda é o método da gota espessa, no qual se usa sangue capilar (Fig 19.3A), geralmente em volumes de 20, 40 ou 60µl (Fig 19.3B). Esse permanece como método de escolha para inquéritos hemoscópicos (Fig. 19.3C) e triagem individual.

Vale salientar que, a partir de 100 e 60Mf/ml, intervalo estimado por filtração em membrana[20], existe 100% de sensibilidade da gota espessa, usando-se 20µl e 60µl de sangue capilar, respectivamente. Entretanto, essa sensibilidade cai para 26 e 52%, se o nível de parasitemia estiver entre 1 e 30Mf/ml, usando-se 20µl e 60µl, respectivamente (Tabela 19.2).

O excesso de álcool utilizado na anti-sepsia da pele para a punção com a lanceta pode fixar parcialmente o sangue, dificultando a desemoglobinização. Fazer grande pressão no local da punção capilar pode liberar líquido intersticial, diluindo a amostra. Antes da desemoglobinização, as lâminas coletadas devem estar bem secas. À temperatura ambiente, a secagem pode levar de 12 a 24 horas, dependendo da umidade. Idealmente, a gota espessa corada deve ser feita com sangue sem anticoagulante, evitando-se perda de ma-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Tabela 19.2
Sensibilidade da Gota Espessa para Detectar Portadores de Microfilária com Vários Níveis de Parasitemia

Mf/ml	n	*Indivíduos Detectados Por Gota Espessa (%)* 20µl	40µl	60µl
1-30	152	26	41	52
31-100	80	68	83	94
101-200	27	89	100	100
≥ 201	128	100	100	100
≥ 1	387	63	73	80

terial durante a fase de desemoglobinização. Porém, se não for possível, podem ser necessárias 48 a 72 horas para secagem completa também à temperatura ambiente; na estufa, a 36°C, pode haver fragmentação e descolamento da gota espessa.

Outras metodologias de mesma sensibilidade também podem ser empregadas, usando-se sangue capilar, embora sejam menos práticas e até mais onerosas em algumas situações, como, por exemplo, a contagem em câmara e a técnica em tubo de micro-hematócrito. As técnicas de concentração, por sua vez, utilizam maiores volumes de sangue de origem venosa (1ml ou mais), o que aumenta em muito a sensibilidade. São idealmente utilizadas em indivíduos com suspeita de baixa densidade de parasitemia, tanto antes e depois do tratamento específico, quanto para se verificar o estado de amicrofilaremia em um determinado momento. A técnica descrita por Knott[35] foi a primeira a ser empregada e pode ser processada com água destilada ou formalina a 2%. Essa técnica já foi substituída em muitos serviços e, especialmente na pesquisa, pela filtração em membrana de policarbonato[11] (Fig. 19.4A e B). Essa última é considerada o *gold test* para a pesquisa de Mf (Fig. 19.4C). A Fig. 19.4D mostra a técnica de filtração sendo processada. As membranas de policarbonato são importadas e podem ser encontradas nas porosidades de 2, 3 e 5µm. Para a bancroftose, deve ser utilizada idealmente a porosidade de 3µm. Um técnico pode ler, sem maiores problemas, até 500Mf/ml em uma membrana de 13mm. Caso exista uma densidade maior que essa, aconselha-se o uso de mais de uma membrana

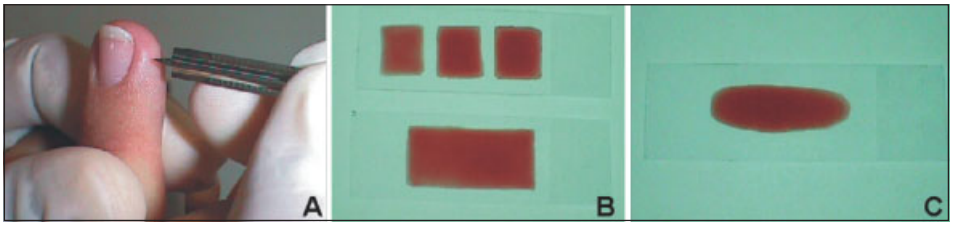


Fig. 19.3 — *A) Local mais apropriado para a colheita capilar. É nessa área que fica o leito capilar mais rico, com a vantagem de evitar o dolorimento posterior, ao tato e à apreensão de objetos, quando se faz a colheita na polpa digital; B) Sangue capilar recém-colhido de forma mensurada. Cada gota contém 20µl de sangue. C) Uma única gota foi confeccionada com 60µl. Notar a retidão das bordas. Isso facilita a leitura em varredura ao microscópio. Quando maior rapidez é exigida na colheita, geralmente para exame de triagem em inquéritos hemoscópicos, a gota pode ter a morfologia oval (mensurada ou não).*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Tabela 19.3
Volume de Sangue Recomendado para Filtração de Acordo com a Densidade da Parasitemia e a Diluição Correspondente, Quando Apenas uma Membrana de 13mm é Utilizada

N.º de Mf Estimado	*Volume Filtrado*
1-100	1 até 3ml
101-500	1ml
501-1.000	50µl
1.001-5.000	100µl
> 5.001	20µl

ou membrana de 25mm (Fig. 19.4A). Normalmente, o sangue não deve ser diluído para a quantificação das microfilárias, especialmente na pesquisa clínica, porém algumas vezes a diluição pode ser utilizada na rotina diagnóstica em áreas onde a densidade de parasitemia da população é alta. Veja na Tabela 19.3 a sugestão de diluição de acordo com a densidade da microfilaremia.

Pode-se, grosseiramente, estimar a densidade das microfilárias antes da filtração por gota a fresco em volumes de 20 e 60µl.

O xenodiagnóstico é uma metodologia em desuso e vem sendo substituído com êxito pela filtração, porém ainda é utilizado para outros fins de pesquisa, no estudo da relação hóspede-hospedeiro ou na obtenção de L3. Salientamos que, qualquer que seja a metodologia empregada, a pesquisa ou a avaliação da densidade da microfilaremia deve ser feita obedecendo-se à periodicidade do aparecimento do embrião em sangue periférico. No caso das áreas endêmicas do Brasil, as Mf são de periodicidade noturna, e seu horário de pico ocorre entre 23:00h e 1:00h da manhã[20]. A estimação da densidade de Mf circulantes pode ser feita por qualquer técnica em que o volume de sangue examinado seja mensurado. Essa quantificação se reveste de importância epidemiológica para estudos de transmissão antes e depois das medidas de controle e para estudo individual, antes e depois do tra-

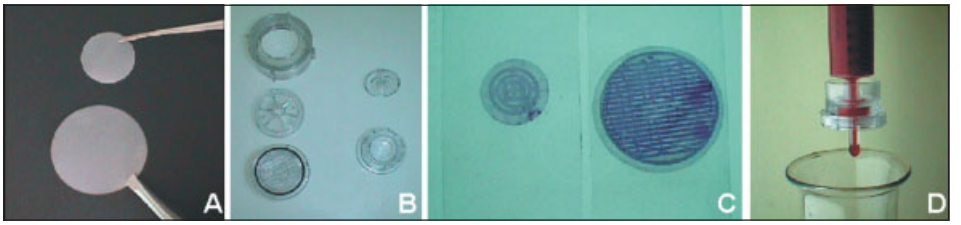


Fig. 19.4 — *A) Membranas de policarbonato antes do uso, de 13 e 25mm, respectivamente. Elas são finas e algo transparentes e seus poros estão dispostos de forma paralela nas diversas camadas que as compõem, permitindo a passagem livremente das hemácias e leucócitos, mas retendo as Mf na superfície do filtro; B) À esquerda, encontram-se os componentes do holder de 25mm e à direita, os de 13mm, utilizados na dependência da densidade de Mf circulantes; C) Essa é a aparência das membranas utilizadas na pesquisa de Mf após fixação e coloração (nesse caso, com a hematoxilina de Carrazzi). A leitura deve ser feita em varredura, idealmente com 150 a 200 aumentos; D) Pesquisa (ou quantificação) de Mf de* W. bancrofti *pela técnica de filtração em membrana de policarbonato. O sangue venoso está diluído em salina. Isso promove a passagem das hemácias íntegras através da membrana, deixando um campo claro para a leitura da mesma ao microscópio.*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

tamento. Qualquer anticoagulante pode ser utilizado para a coleta do sangue, no qual se vai pesquisar Mf. A pesquisa de Mf em outros líquidos deve ser feita pela técnica de concentração de Knott, examinado-se o sedimento após centrifugação da amostra (a fresco ou após fixação, geralmente com formalina). Todo o sedimento deve ser analisado, para o exame ser considerado negativo, o que consome muito tempo em relação às outras metodologias. Ao contrário do líquido quilocélico (Fig. 19.5), o fluido da hidrocele não deve conter microfilárias.

Caso isso ocorra, pode ter havido contaminação com sangue periférico durante a punção ou ter-se obtido linfa e não fluido hidrocélico. Quando essa linfa é leitosa, existe a denominação de quilocele. No caso de pesquisa de Mf na urina, ela pode ser feita com urina de 12 ou 24 horas, conservando-se a mesma na geladeira, entre as diversas micções, com ou sem formalina. Entretanto, para fins diagnósticos da infecção, a pesquisa de Mf deve ser sempre feita em sangue periférico. Atualmente, consideramos amicrofilarêmicos aqueles indivíduos adultos que sejam negativos em 16ml de sangue venoso[21]. As crianças são consideradas amicrofilarêmicas quando negativas em um volume de sangue de 11ml, utilizando-se a técnica de filtração[29]. Caso a suspeita ainda persista após um exame negativo, a pesquisa do embrião pode ser repetida a cada três meses, no mesmo volume supracitado. Sugerimos orientar os habitantes de área endêmica para que os mesmos procurem, a cada seis meses, os postos de saúde das prefeituras ou da Fundação Nacional da Saúde para fazer a pesquisa de Mf em sangue capilar.

Técnicas para Identificação da Espécie de Microfilária

O exame microscópico a fresco tem sua limitação. Apesar de revelar mais facilmente a presença da microfilária pelo seu movimento ativo, não permite a identificação da espécie. A Mf corada pela hematoxilina de Carrazzi na técnica da gota espessa ou, mais idealmente, após fixação em formalina a 2%, permite melhor visualização das estruturas, facilitando a classificação da espécie.



Fig. 19.5 — *Mf de* W. bancrofti *degenerada: examinada a fresco em fluido quilocélico de um paciente portador de microfilaremia. Quando o derramamento de linfa para a cavidade vaginal testicular é recente, as Mf são encontradas vivas (10X16).*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Sob a lente do microscópio óptico e com o auxílio de uma variedade de corantes, a Mf tem a forma serpiginosa e é preenchida pelos núcleos de suas diversas células. Na maioria das espécies, o corpo pode ser envelopado por uma membrana chamada bainha da microfilária (b). A bainha pode se estender por uma curta distância por sobre a microfilária ou ultrapassar suas extremidades, possibilitando-a deslizar dentro de sua bainha. Em certas espécies, dependendo do corante que é usado, a bainha exibe qualidade de coloração característica, o que facilita a identificação da espécie. Os núcleos das células que constituem a Mf tornam-se escuros quando corados e se mostram dispersos ou aglomerados. A extremidade anterior tipicamente não apresenta núcleos e é denominada espaço cefálico (ec), que pode ser curto ou longo. No corpo da microfilária existem outros espaços e células que servem como marcadores anatômicos. Dentre estes, estão: o anel nervoso (an), o poro excretor (pe), a célula excretora (ce) e o poro anal (pa). Em certas espécies, pode-se visualizar, com o auxílio de corantes especiais, uma massa amorfa, chamada corpo central (cc), e quatro pequenas células, chamadas de células retais (R-1, R-2, R-3, R-4). Tais estruturas e sua posição podem ser de utilidade na identificação das espécies. Também é útil, para o mesmo propósito, observar a distribuição ou a ausência dos núcleos dentro da Mf e o formato da cauda. Tanto a hematoxilina de Carrazzi como o Giemsa contra-corado com a eosina são corantes adequados para se visualizarem as estruturas das Mf acima descritas (Fig. 19.6).

A Fig. 19.7 mostra as características morfológicas da Mf de *W. bancrofti* e como diferenciá-las das outras espécies que infectam o homem.

Na Fig. 19.8 encontra-se uma Mf de *W. bancrofti* obtida pela técnica de gota espessa e corada pela hematoxilina de Carrazzi. Na Tabela 19.4, encontram-se as características biológicas principais da Mf de *W. bancrofti*.

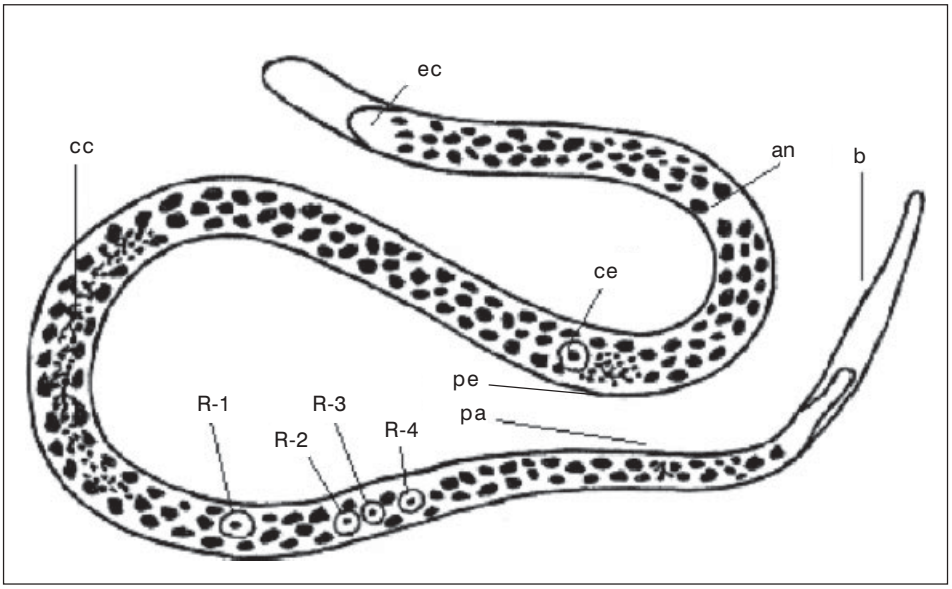


Fig. 19.6 — *Esquema morfológico geral de uma microfilária: (ec) espaço cefálico; (an) anel nervoso; (b) bainha; (ce) célula excretora; (cc) corpo central; (pe) poro excretor; (pa) poro anal; (R) célula retal.*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

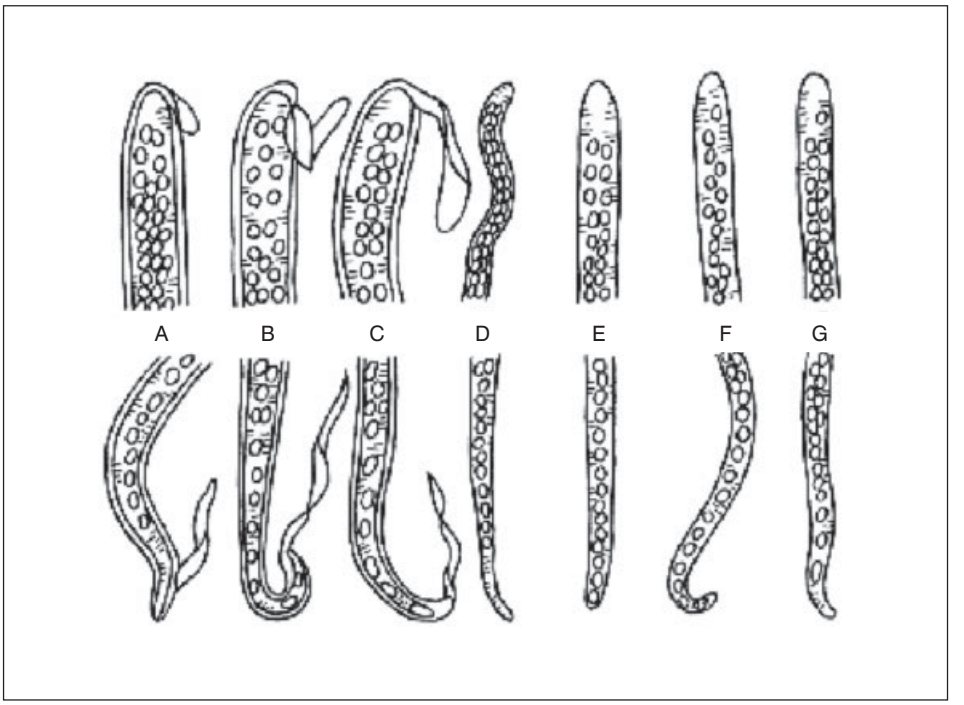


Fig. 19.7 — *Características morfológicas da porção cefálica e caudal das Mf de: A)* W. bancrofti*; B)* Brugia malayi*; C)* Loa loa*; D)* Onchocerca volvulus*; E)* Mansonella perstans*; F)* M. streptocerca*; G)* M. ozzardi *(Segundo Craig CF, Faust ECF. Clinical Parasitology. Philadelphia: Lea & Febiger; 1970, com permissão do editor).*

Tabela 19.4
Características Biológicas da *Wuchereria bancrofti*

Característica	*Microfilária*	*Verme adulto*
Hábitat	Sangue	Sistema linfático (principalmente vasos)
Periodicidade	Periódica noturna Subperiódica (Papua-Nova Guiné)	
Bainha	Presente (não se cora pelo Giemsa)	
Comprimento	gota-espessa → 244-296μm (média 260) formalina a 2% → 275-317μm (média 298)	Macho: 3-4cm Fêmea: 8-10cm
Largura (μm)	7,5-10,0	Macho: 50 Fêmea: 200
Cauda	Fina e anucleada	Fêmea: curvada ventralmente Macho: espiralada
Tempo médio de vida	Pelo menos 6 meses	De 5 a 8 anos
Outras características	• pequeno espaço cefálico • núcleos dispersos bainha não se cora pelo Giemsa	Se movimentam continuamente e podem ser vistos *in vivo* pela ultra-sonografia
Resposta antifilarial		
- Dec	+	+ (atua em cerca de 50%)
- Ivermectina	++	– (não afetam a viabilidade)

+ Presente, mas não total; ++ Total; - Negativo.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

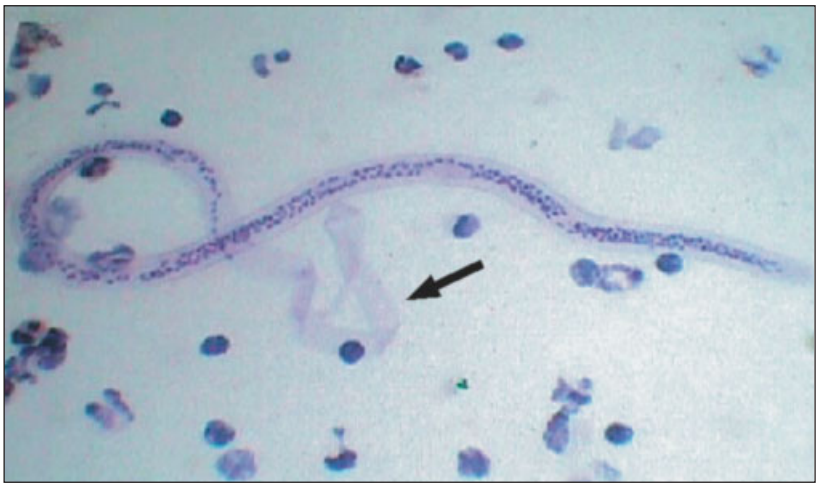


Fig. 19.8 — *Microfilária de* W. bancrofti *na gota espessa corada pela hematoxilina de Carrazzi. Notar a presença da bainha bem visível (seta), e os núcleos dos leucócitos bem corados (10X40).*

Coloração pela Hematoxilina, segundo Carrazzi

Reagentes

1. Hematoxilina (CI 75290-Merck) ($C_{16}H_{14}O_6$)
2. Sulfato de alumínio e potássio (alúmen de potássio) ($AlK(SO_4)_2.12H_2O$)
3. Glicerina ($C_3H_8O_3$)
4. Álcool metílico (CH_4O)
5. Iodeto de potássio (KI)
6. Resina sintética (*Cytoseal* 60)

Preparação do Corante

Alúmen de potássio	25g
Iodeto de potássio	0,1g
Hematoxilina	0,5g
Glicerina	100ml
Água destilada-deionizada	400ml

• Colocar os componentes sólidos (hematoxilina, alúmen de potássio e iodeto de potássio) em um *beaker* e adicionar 200ml de água destilada-deionizada. Misturar e adicionar a glicerina e os restantes 200ml de água destilada-deionizada. Agitar bem e aquecer até a completa dissolução dos ingredientes. Armazenar a solução em frasco âmbar com tampa esmerilhada até 45 dias.

Fixação

1. Gota Espessa — Após a desemoglobinização e secagem ao ar, fixar o esfregaço com álcool metílico por três a cinco minutos.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Filtros *Nuclepore* — Fixar o filtro com álcool metílico, colocando-o sobre uma lâmina. Deixar o álcool metílico sobre a lâmina até a completa evaporação.

Coloração

Gota Espessa

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.

2. Corar o esfregaço com a solução corante de hematoxilina por três minutos.

3. Aquecer o esfregaço por três minutos até a emissão de vapores. Não deixar o corante entrar em ebulição e/ou secar.

4. Escoar o corante sem lavar a lâmina.

Filtros Nuclepore

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.

2. Corar o filtro com a solução corante de hematoxilina por três minutos.

3. Aquecer a lâmina por três minutos até a emissão de vapores. Não deixar o corante entrar em ebulição e/ou secar.

4. Escoar o corante lentamente sem lavar a lâmina, observando se o filtro continua aderido à lâmina. Absorver, com papel absorvente, o excesso do corante.

Periodicidade

Algumas espécies de Mf circulam no sangue periférico dia e noite, enquanto outras só estão presentes em períodos determinados. A essa flutuação do número de Mf no sangue periférico, num intervalo de 24 horas, dá-se o nome de periodicidade. As espécies encontradas no sangue no período da noite recebem a designação de microfilárias de periodicidade noturna (por exemplo, a *W. bancrofti* e a *B. malayi*); aquelas encontradas apenas no período do dia recebem designação de microfilárias de periodicidade diurna (por exemplo, a *L. loa*). As Mf sempre presentes no sangue, mas que têm sua densidade elevada em certos períodos do dia ou da noite, são classificadas como subperiódicas. Microfilárias que circulam no sangue periférico em um intervalo de 24 horas, sem que haja variação significante de seu número, são não-periódicas ou aperiódicas. Até o momento, não se conhecem as razões que determinam a periodicidade. Especula-se que o parasito tenta adequar-se aos hábitos de hematofagia do vetor, isto é, diurnos ou noturnos, assegurando, dessa forma, a perpetuação da espécie.

Teste Provocativo com DEC

Em áreas onde a microfilária tem periodicidade noturna, a DEC em dose única e baixa (1 a 2mg/kg) provoca a saída das Mf para o sangue periféri-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

co durante o dia, 30 minutos após a tomada da droga[10,51,54,62]. Em função dos avanços recentes na pesquisa diurna da infecção, através do antígeno circulante, e como muitos pacientes apresentam níveis de microfilárias que podem ser detectados durante o dia, usando-se técnicas de concentração[20], esse teste, atualmente, caiu em desuso.

Pesquisa de Verme Adulto

Os vermes adultos (VA) filariais são cilíndricos, finos e longos, usualmente medindo vários centímetros de comprimento. O orifício bucal é simples, circular, ou dorso-ventralmente alongado, e circundado por papilas. Os lábios estão ausentes e a cavidade bucal é rudimentar. O esôfago é fino e não tem musculatura. Reproduzem-se de forma sexuada e as fêmeas produzem milhões de microfilárias durante sua vida. Dependendo da espécie, os VA vivem em vasos, tecidos ou cavidades dos hospedeiros vertebrados. Na Tabela 19.4, encontram-se as características biológicas do VA de *W. bancrofti*. A Fig. 19.9 mostra a parte cefálica de uma fêmea de *W. bancrofti* em microscopia de varredura.

Biópsia

Vermes adultos degenerados, calcificados[33,34] ou aparentemente intactos[30] podem ser encontrados em material de biópsia. Normalmente, a adenectomia, como método de diagnóstico de doença filarial, não deve constituir uma rotina para a pesquisa do parasito, apesar de poder ter espaço no diagnóstico diferencial em relação a outras adenopatias. Por outro lado, a persistência da suspeita de filariose e sua falta de comprovação clínico-laboratorial levam à indicação de biópsia de nódulos em vasos linfáticos encontrados ao exame físico, principalmente no conteúdo escrotal.

Ultra-Sonografia

A inexistência de uma técnica capaz de detectar vermes adultos *in vivo* perdurou até recentemente, quando a ultra-sonografia se mostrou efetiva na



Fig. 19.9 — *Região cefálica de fêmea adulta de* W. bancrofti *vista pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). (Cortesia da Dra. AC Araujo.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

identificação e localização desses vermes em segmentos de vasos linfáticos dilatados da região escrotal. Através do ultra-som, com sonda de 7,5MHz, pôde-se detectar os vermes, graças aos seus movimentos ativos e contínuos, o que foi denominado sinal da dança da filária (SDF)[1]. Verificou-se, ainda, que esses parasitos não mudam de localização, mesmo quando submetidos à ação de variados estímulos[17] e que 88% dos indivíduos microfilarêmicos, assintomáticos e do sexo masculino têm VA nos linfáticos intra-escrotais[27,44]. O SDF pode ser visto com sonda de 7,5MHz, quando o calibre do vaso linfático é superior a 1mm de diâmetro[45]. Em vasos de maiores diâmetros, o SDF pode ser detectado até com sonda de 3,5MHz[25]. A ultrasonografia se mostrou também útil na visualização desse estádio do parasito em outras localizações, como nos linfáticos superficiais da mama feminina[19], dos membros superiores e inferiores, do canal inguinal e em linfonodos[29]. A presença de linfangiectasia em linfáticos intra-escrotais, detectada ao exame físico ou por ultra-sonografia, é indicativa de infecção ativa ou passada[27], estabelecendo-se como mais um critério importante nas metodologias de diagnóstico da doença filarial.

Diagnóstico Sorológico

Atualmente, a pesquisa de anticorpo como marcador de doença/infecção filarial está descredenciada, quer seja pela imunofluorescência contra a microfilária[14], quer seja por ELISA, mesmo se utilizando a pesquisa do isotipo IgG4 específico[47]. Foi demonstrado que não é possível distinguir o paciente portador do quadro da EPT daquele portador de outra síndrome denominada de EPT-*like*, produzida por helmintos intestinais muito comuns em áreas endêmicas para bancroftose[49]. Assim, o diagnóstico da infecção ou doença bancroftiana, utilizando-se anticorpos circulantes, não deverá ser empregado nem na rotina, nem na pesquisa. Deverá ser substituído pelos novos testes do antígeno circulante.

Até o momento, dois anticorpos monoclonais (AcMo) foram obtidos e são utilizados com a técnica imunoenzimática (ELISA). Denominam-se testes do Og4C3 (obtido da *O. gibsoni* — filária bovina) e do AD12 (obtido da *W. bancrofti*). Ambos os AcMo parecem reconhecer produtos excretórios e secretórios de vermes adultos de *W. bancrofti*[5,43,55,57,58].

Estudos desenvolvidos em Recife[50] mostraram que o Og4C3 possui 100% de sensibilidade quando o indivíduo apresenta uma densidade ≥ 1Mf/ml de sangue. Por outro lado, o teste reconhece somente cerca de 70% dos indivíduos amicrofilarêmicos, porém portadores de vermes adultos vivos. O teste do Og4C3 está comercializado e já é utilizado rotineiramente pelos laboratórios de patologia clínica em muitas áreas endêmicas, incluindo a Grande Recife. Estudos complementares sobre sua especificidade devem ser encorajados e, no momento, já houve relato de reação cruzada do Og4C3 com pacientes portadores de dracunculíase[2]. Assim, é importante ter cautela em se interpretar um teste positivo de antigenemia em um paciente procedente de uma área de baixa transmissibilidade, pois o teste não parece apresentar 100% de especificidade quando aplicado em indivíduos de área não-endêmica de bancroftose e livre de dracunculíase[50].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Recentemente, a *Diagnostics Immunochromatographic Diagnostic Tests* (ICT) lançou comercialmente o teste rápido em cartões com anticorpo AD12 utilizando soro, plasma ou mesmo sangue total capilar[59], cuja leitura pode ser feita em até 15 minutos (Fig. 19.10A e B). Pela simplicidade, esse teste parece bastante promissor para ser utilizado em larga escala em áreas endêmicas, tendo a vantagem também de ser empregado a qualquer hora do dia, como o Og4C3. A sensibilidade do ICT é um pouco menor que a do Og4C3, porém não parece comprometer sua validade diagnóstica. Como ambos os AcMo parecem reconhecer antígeno(s) do estádio de verme adulto do parasito, deve-se *a priori* interpretar-se o teste positivo como sendo o resultado da presença do verme adulto, independentemente do *status* de microfilaremia dos pacientes quando eles são procedentes de áreas de alta transmissibilidade. Acredita-se que o ICT tenha 100% de especificidade, porém estudos com amostras maiores devem ser ainda realizados para garantir esse fato.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Por ser a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) uma técnica que possibilita uma ampla aplicação no campo do diagnóstico das doenças infectoparasitárias, muitos pesquisadores estão trabalhando no sentido de detectar DNA de *W. bancrofti* nos diversos líquidos biológicos humanos[53,61,64].

A técnica da PCR tem sua aplicação prática para o diagnóstico da oncocercose, na qual sua sensibilidade excede os resultados da nodulectomia[65]. Por outro lado, de uma forma geral, os ensaios baseados na técnica da PCR parecem ter um valor menos prático como teste diagnóstico para bancroftose, pois não parecem detectar DNA livre. Entretanto, a utilização dessa técnica em mosquitos é uma metodologia importante e muito promissora na monitorização da transmissão da filariose linfática[4,12].

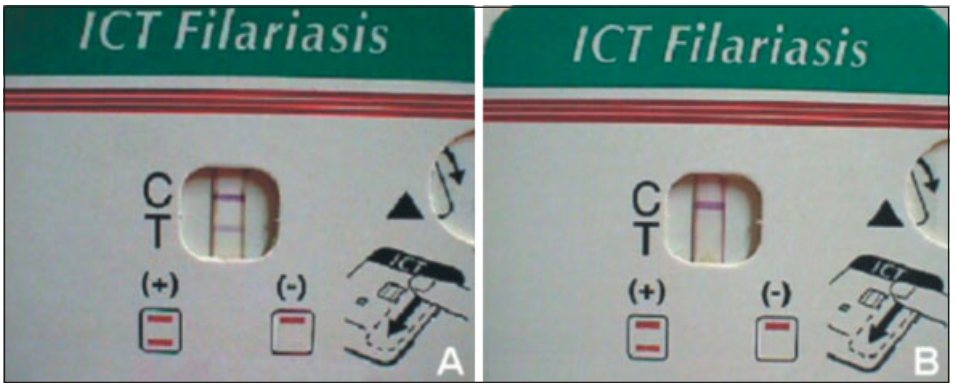


Fig. 19.10 — *A) Pesquisa de antígeno de* W. bancrofti *em sangue capilar, utilizando o cartão impregnado com anticorpo monoclonal AD12. Resultado positivo. Esse teste é só qualitativo, logo, não se pode estimar a carga parasitária com diferentes padrões de intensidade da banda revelada; B) Resultado negativo para a pesquisa de antígeno na bancroftose. Como a sensibilidade do teste não é 100%, não se pode afastar a infecção filarial. Outros testes podem ser necessários na investigação parasitológica.*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Outros Exames Complementares

Contagem Absoluta de Eosinófilos

Muitas espécies de helmintos podem causar infiltrado pulmonar e eosinofilia, resultando na síndrome eosinofílica pulmonar (SEP) uma condição transitória decorrente da migração dos vermes através do pulmão[8]. Os vermes filariais são os que mais freqüentemente causam uma variante crônica da SEP, conhecida como Eosinofilia Pulmonar Tropical ou EPT[9,40,60]. A EPT ocorre, particularmente, em pacientes do sexo masculino, não parece existir em indivíduos com menos de 15 anos de idade e acomete apenas uma parcela muito pequena da população infectada com a filariose linfática[22,36]. Os outros helmintos podem também causar uma síndrome pulmonar similar, denominada de "EPT-*like*"[50]. A EPT se caracteriza, clinicamente, por ataques asmatiformes e tosse paroxística predominantemente noturnos, anorexia e perda de peso. É a única forma clínica da filariose bancroftiana que cursa com eosinofilia periférica, cujos níveis encontrados estão situados sempre acima de 2.500 a 3.000/mm^3, podendo chegar a valores tão altos quanto 60.000/mm^3. Os eosinófilos periféricos são maduros e podem apresentar vacúolos no citoplasma. De uma forma característica, a pesquisa de microfilária em sangue periférico é, consistentemente, negativa, mesmo quando se analisam volumes maiores de sangue, como 10 a 20ml. Daí, a EPT ser também conhecida como "filariose oculta"[32]. É importante ressaltar que essa síndrome é a apresentação clínica da filariose que pode causar morte por fibrose intersticial pulmonar. Dessa forma, existindo dúvidas quanto ao diagnóstico diferencial em relação a outras síndromes pulmonares eosinofílicas, o teste terapêutico com a DEC se faz imperativo (ver Tabela 19.1). Lembramos, assim, que o achado de eosinofilia periférica em um determinado indivíduo, que não preenche os critérios clínicos para a suspeita de EPT[7,30], não deve desencadear a investigação para infecção pela *W. bancrofti*. Por outro lado, a morte da microfilária circulante, provocada tanto pela DEC quanto pela ivermectina, induz uma eosinofilia transitória[6], que volta aos níveis pré-tratamento em cerca de 30 dias. Para quantificar o número de eosinófilos circulantes, antes e depois do tratamento, nos casos de EPT, o ideal é utilizar a contagem em câmara e, preferencialmente, ajustar as coletas sempre para a mesma hora do dia, para melhor comparação entre as tomadas. Existe uma queda importante logo na primeira semana após o início do tratamento com a DEC. Os pacientes podem permanecer ainda com uma eosinofilia periférica discreta (até 1.000 eos/mm^3) até um ano após os tratamentos, mesmo aqueles considerados bem-sucedidos.

Parasitológico das Fezes

A pesquisa de helmintos intestinais deve ser feita sempre em pacientes suspeitos de EPT, tendo-se o cuidado de fazer várias amostras seriadas, no sentido de aumentar a sensibilidade, para se buscarem larvas de *Strongyloides stercoralis*[19]. Alertamos para o fato de que normalmente são os helmintos intestinais que induzem à eosinofilia periférica, tão comum nas áreas endêmicas de filariose.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Sumário de Urina

É indicado na avaliação dos microfilarêmicos do sexo masculino, pela possibilidade de serem portadores de hematúria. Quando se institui o tratamento antifilarial com DEC ou com ivermectina nos indivíduos com doença renal, observa-se uma exacerbação transitória da proteinúria, enquanto a microhematúria desaparece, em paralelo com o *clearence* das microfilárias circulantes[15]. É interessante observar que muitos dos indivíduos com parasitemia, nos quais não se encontram hematúria microscópica nem proteinúria pré-tratamento, ao receberem medicação antifilarial, apresentam um sumário de urina denunciando, de modo transitório, hemácias na sedimentoscopia[6].

O sumário de urina é também importante como exame de triagem, quando se investigam os pacientes com suspeita de quilúria. Nesse caso, deverá haver um grande número de células mononucleares e de hemácias no sedimento, estando também presente proteinúria. Uma forma prática de se fazer a diferenciação entre a quilúria e outras afecções que turvam ou tornam a urina leitosa é através da decantação espontânea ou centrifugação. Na quilúria, não existe uma separação nítida entre o sedimento e o sobrenadante, visualizada, por exemplo, na fosfatúria e na piúria. É interessante comentar a presença ocasional de trombos proteináceos na urina dos pacientes portadores de quilúria. Eles podem ser esbranquiçados ou conter hemácias em seu interior. Não raramente, esses trombos podem provocar dificuldades miccionais, predominando nos pacientes do sexo masculino e necessitando às vezes de cateterismo de alívio.

Pesquisa de Linfócitos

Quando o sumário de urina é anormal, sugerindo quilúria, procede-se à pesquisa de linfócitos. A presença dessas células de forma predominante no sedimento fecha questão com relação ao diagnóstico de quilúria. Existindo dúvida, o sedimento, após fixado na lâmina, pode ser examinado após uso de corante hematológico, tornando facilmente os linfócitos identificáveis. O diagnóstico de quilúria de origem filarial é feito por exclusão, embora o encontro da Mf na urina conduza fortemente à possibilidade da etiologia filarial do processo. Porém, a quilúria pode também ser causada por traumatismo, gravidez, tuberculose, tumores, malformação linfática, entre outros fatores. Assim, o diagnóstico etiológico diferencial se impõe em todo paciente portador de quilúria.

Contagem de Addis

Está indicada quando o sumário revelar hemácias no sedimento. O exame deverá ser feito antes e depois do tratamento dos pacientes portadores de hematúria de origem filarial, com a finalidade de monitorização da resposta terapêutica antifilarial. Se a hematúria persistir até 30 dias após o tratamento, procede-se novamente à quantificação de microfilárias no sangue e, sendo positiva, o paciente deverá ser novamente tratado. A monitorização pela

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

contagem de Addis e a pesquisa de microfilárias circulantes poderão ser feitas a cada três ou seis meses. Nos portadores de quilúria, recomenda-se fazer a quantificação da perda de linfócitos antes e depois de iniciada a dieta (que deve ser sempre hipolipídica e hiperprotéica).

Proteinúria de 24 horas

Deve ser feita sempre em pacientes com suspeita de quilúria e para monitorizar a resposta à dieta hipolipídica, possibilitando os ajustes necessários. Os valores da proteinúria, antes do tratamento, geralmente guardam relação direta com o dano linfático e podem chegar a até 40g/24h. Normalmente, classificamos o paciente, de acordo com a perda protéica, nas 24 horas, como: baixo débito, até 1.000mg; médio débito, até 5.000mg; alto débito, até 10.000mg; e altíssimo débito, acima de 10.000mg.

A quilúria acomete, em proporções iguais, homens e mulheres (microfilarêmicos em 50% dos casos dos adultos jovens). A despeito de sua característica intermitente de apresentação, é a mais consumptiva de todas as manifestações clínicas da bancroftose. Daí ser comum o quadro de astenia e de perda de peso corporal, justificado, apenas em parte, pela anorexia que esses pacientes apresentam. É, na verdade, a perda urinária de proteínas a principal razão da debilitação física apresentada pelos pacientes. O que se excreta em excesso na urina é, particularmente, fibrinogênio e imunoglobulinas, por isso o resultado é a perda de peso e não o edema generalizado, como ocorre em outras situações em que há albuminúria (na síndrome nefrótica, por exemplo). Contudo, somente em casos excepcionais, o prejuízo causado pela excreção de imunoglobulinas e também de linfócitos é capaz de fazer com que esses indivíduos padeçam de um comprometimento imunológico decorrente desse processo. Concomitantemente à quilúria, existe sempre micro-hematúria. Na dependência da importância do sangramento e do volume de diurese, a hematúria pode ser micro ou macroscópica. Neste último caso, a quilúria é mais bem denominada como hematoquilúria.

A perda de proteína, associada à hematúria de origem filarial, é sempre de baixo débito e também desaparece com o *clearance* das microfilárias circulantes.

Clearance de Creatinina

Deve ser feito em todo paciente portador de quilúria, na avaliação de rotina pré-tratamento. Se anormal, ou se o paciente não conseguir ficar assintomático com a dieta, deve ser repetido semestralmente.

Linfocintigrafia

É recomendada para pacientes com linfedema, para detectar as alterações anatômicas e funcionais do sistema linfático. Pode ser utilizada para estudo tanto do sistema superficial quanto do profundo, mais comumente dos

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

membros superiores e inferiores. Esse exame de imagem, no entanto, não estabelece a etiologia filarial do edema ou da anormalidade linfática[37].

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amaral F, Dreyer G, Figueredo-Silva J et al. Live adult worms detected by ultrasonography in human bancroftian filariasis. Am J Trop Med Hyg 50:753-757, 1994.
2. Bloch P, Simonsen PE, Weiss N et al. The significance of guinea worm infection in the immunological diagnosis of onchocerciasis and bancroftian filariasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 92:518-521, 1998.
3. Brabin L. Sex differentials in susceptibility to lymphatic filariasis and implications for maternal child immunity. Epidemiol Infect 105:335-353, 1990.
4. Chanteau S, Luquiaud P, Failloux AB et al. Detection of *Wuchereria bancrofti* larvae in pools of mosquitoes by the polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg 88:665-666, 1994.
5. Chanteau S, Moulia-Pelat JP, Glaziou P et al. Og4C3 circulating antigen: a marker of infection and adult worm burden in *Wuchereria bancrofti* filariasis. J Infect Dis 170:247-250, 1994.
6. Coutinho A, Dreyer G, Medeiros Z et al. Ivermectin treatment of bancroftian filariasis in Recife, Brazil. Am J Trop Med Hyg 50:339-348, 1994.
7. Coutinho A, Rocha A, Medeiros Z et al. Eosinofilia pulmonar tropical filariótica e o seu diagnóstico diferencial. Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo 53:42-51, 1998.
8. Crofton JW, Livingstone JL, Oswald NC et al. Pulmonary eosinophilia. Thorax 7:1-35, 1952.
9. Danaraj TJ, Pacheco G, Shanmugaratnam K et al. The etiology and pathology of eosinophilic lung (tropical eosinophilia). Am J Trop Med Hyg 15:183-189, 1966.
10. De McMahon JEC, Marshall TF, Vaughn JP et al. Tanzania filariasis project: a provocative day test with diethylcarbamazine form the detection of microfilariae of nocturnally periodic *Wuchereria bancrofti* in the blood. Bull WHO 57:759-765, 1979.
11. Dennis DT, Kean BH. Isolation of microfilariae: report of a new method. J Parasitol 57:1146-1147, 1971.
12. Dissanayake S, Min X, Piessens WF. Detection of amplified *Wuchereria bancrofti* DNA in mosquitoes with a nonradioactive probe. Mol Biochem Parasitol 45: 49-56, 1991.
13. Dondero TJ, Mullin SW, Balasingam S. Early clinical manifestations in filariasis due to *Brugia malayi*: observations on experimental infections in man. SE Asian J Trop Med Publ Hlth 3:569-575, 1972.
14. Dreyer G, Andrade L, Espirito Santo M et al. Avaliação do teste de imunofluorescência indireta para diagnóstico da filariose bancroftiana usando a microfilária de *Wuchereria bancrofti* como antígeno, em Recife — PE, Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo 33:397-404, 1991.
15. Dreyer G, Ottesen EA, Galdino E et al. Renal abnormalities in microfilaremic patients with bancroftian filariasis. Am J Trop Med Hyg 46:745-751, 1992.
16. Dreyer G, Pires ML, Andrade LD et al. Tolerance of diethylcarbamazine by microfilaraemic and amicrofilaraemic individuals in an endemic area of bancroftian filariasis., Recife, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 88:232-236, 1994.
17. Dreyer G, Amaral F, Norões J et al. Ultrasonographic evidence for stability of adult worm location in bancroftian filariasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 88:558, 1994.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

18. Dreyer G, Norões J, Amaral F et al. Direct assessment of the adulticidal efficacy of single dose ivermectin in bancroftian filariasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 89:441-443, 1995.

19. Dreyer G, Brandão AC, Amaral F et al. Detection by ultrasound of living adult *Wuchereria bancrofti* in the female breast. Mem Inst Oswaldo Cruz 91:95-96, 1996.

20. Dreyer G, Pimentel A, Medeiros Z et al. Studies on the periodicity and intravascular distribution of *Wuchereria bancrofti* microfilariae in paired samples of capillary and venous blood from Recife, Brazil. Trop Med Int Hlth 1:264-72, 1996.

21. Dreyer G, Santos A, Norões J et al. Amicrofilaraemic carriers of adult *Wuchereria bancrofti*. Trans R Soc Trop Med Hyg 90:288-289, 1996.

22. Dreyer G, Norões J, Rocha A et al. Detection of living adult *Wuchereria bancrofti* in a patient with tropical pulmonary eosinophilia. Brazilian J Med Biol Res 29:1005-1008, 1996.

23. Dreyer G, Addiss D, Norões J et al. Ultrasonographic assessment of the adulticidal efficacy of repeated high-dose ivermectin in bancroftian filariasis. Trop Med Int Hlth 1:427-432, 1996.

24. Dreyer G, Norões J. Dietilcarbamazina no tratamento da filariose bancroftiana. Rev Soc Bras Med Trop 30:229-240, 1997.

25. Dreyer G, Santos A, Norões J et al. Ultrasonographic Detection of Living adult *Wuchereria bancrofti* Using a 3.5 MHz Transducer. Am J Trop Med Hyg 59:399-403, 1998.

26. Dreyer G, Medeiros Z, Netto MJ et al. Acute attacks in the extremities of persons living in an area endemic for bancroftian filariasis: differentiation of two syndromes. Trans R Soc Trop Med Hyg 93:1-5, 1999.

27. Dreyer G, Santos A, Norões J et al. Proposed panel of diagnostic criteria, including the use of ultrasound, to refine the concept of "endemic normals" in lymphatic filariasis. Trop Med Int Hlth 4:575-579, 1999.

28. Dreyer G, Dreyer P, Piessens W. Extralymphatic disease due to bancroftian filariasis. Brazilian J Med Biol Res 32:1467-1472, 1999.

29. Dreyer G, Norões J, Addiss D et al. Bancroftian filariasis in a paediatric population: an ultrasonographic study. Trans R Soc Trop Med Hyg. (no prelo)

30. Figueredo-Silva J, Dreyer G, Guimarães K et al. Bancroftian lymphadenophathy: absence of eosinophils in tissues despite peripheral blood hypereosinophilia. J Trop Med Hyg 97:55-59, 1994.

31. Fontes G, Rocha EMM, Brito AC et al. Lymphatic filariasis in 32 brazilian urban area (Maceió, Alagoas). Mem Inst Oswaldo Cruz 93:705-710, 1998.

32. Joe LK. Occult filariasis: its relationship with tropical pulmonary eosinophilia. Am J Trop Med Hyg 11:646-52, 1962.

33. Jungmann P, Figueredo-Silva J, Dreyer G. Bancroftian lymphadenophathy: a histopathologic study of fifth-eight cases from Northeastern Brazil. Am J Trop Med Hyg 45:325-331, 1991.

34. Jungmann P, Figueredo-Silva J, Dreyer G. Bancroftian lymphangitis in Northeastern Brazil: a histopathological study of 17 cases. J Trop Med Hyg 95:114-118, 1992.

35. Knott J. A method for making microfilarial surveys on day blood. Trans R Soc Trop Med Hyg 32:191-6, 1939.

36. Magnussen P, Makunde W, Simonsen PE et al. Chronic pulmonary disorders, including tropical pulmonary eosinophilia, in villages with endemic lymphatic filariasis in Tanga region and in Tanga town, Tanzania. Trans R Soc Trop Med Hyg 89:406-409, 1995.

37. Marchetti F, Piessens FW, Medeiros Z et al. Abnormalities in the leg lymphatics are not specific for bancroftian filariasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 92:650-652, 1998.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

38. Medeiros Z, Dreyer G, Andrade L et al. *Wuchereria bancrofti* microfilarial density of autochthonous cases and natural *Culex* infectivity rates in Northeast Brazil. J Trop Med Hyg 95:214-217, 1992.

39. Medeiros Z, Gomes J, Beliz F et al. Screening of army soldiers for *Wuchereria bancrofti* infection in metropolitan Recife region, Brazil: implications for epidemiologic surveillance. Trop Med Int Hlth 4:499-505, 1999.

40. Meyers FM, Kouwenaar W. Over hypereosinophilie en over een merkwaardigen vorm van filariasis. Geneeskd Tijdschr Ned-Indie 79:853-873, 1939.

41. Michael E, Bundy DAP, Grenfell BT. Re-assessing the global prevalence and distribution of lymphatic filariasis. Parasitology 112:409-428, 1996.

42. Ministério da Saúde. Superintendência de Campanhas de Saúde Pública. Departamento de Erradicação e Controle de Endemias. In: Demonstrativo dos resultados obtidos em 1985 e projeções para 1986. Brasília (DF), 83-88, 1986.

43. More SJ, Copeman DB. A highly specific and sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating antigen in bancroftian filariasis. Trop Med Parasitol 41:403-406, 1990.

44. Norões J, Addiss D, Amaral F et al. Occurrence of living adult *Wuchereria bancrofti* in the scrotal area of men with microfilaremia. Trans R Soc Trop Med Hyg 90:55-56, 1996.

45. Norões J, Addiss D, Santos A et al. Ultrasonographic evidence of abnormal lymphatic vessels in young men with adult *Wuchereria bancrofti* infection in the scrotal area. J Urol 156:409-12, 1996.

46. Norões J, Dreyer G, Santos A et al. Assessment of the efficacy of diethylcarbamazine on adult *Wuchereria bancrofti* in vivo. Trans R Soc Trop Med Hyg 91:78-81, 1997.

47. Ottesen EA, Skvaril F, Tripathy SP et al. Proeminence of IgG4 antibody response to human filariasis. J Immunol 134:2707-2712, 1985.

48. Pani SP, Balakrishnan N, Srividya A et al. Clinical epidemiology of bancroftian filariasis: effect of age and gender. Trans R Soc Trop Med Hyg 85:260-264, 1991.

49. Rocha A, Dreyer G, Poindexter RW et al. Syndrome resembling tropical pulmonary eosinophilia but of non-filarial aetiology: serological findings with filarial antigens. Trans R Soc Trop Med Hyg 89:573-575, 1995.

50. Rocha A, Addiss D, Ribeiro ME et al. Evaluation of the Og4C3 ELISA in *Wuchereria bancrofti* infection: Infected persons with undetectable or ultra-low microfilarial densities. Trop Med Int Hlth 1:859-864, 1996.

51. Sabry M. A quantitative analysis of the diagnostic value of dietylcarbamazine provocation in endemic *Wuchereria bancrofti* infection. Trans R Soc Trop Med Hyg 82:117-121, 1988.

52. Schacher JF, Sahyoun PF. A chronological study of the histopathology of filarial disease in cats and dogs caused by *Brugia pahangi* (Buckley and Edeson, 1956). Trans R Soc Trop Med Hyg 61:234-243, 1967.

53. Siridewa K, Karunanayake EH, Chandrassekharan NV. Polymerase chain reaction-based technique for the detection of *Wuchereria bancrofti* in human blood samples, hydrocele fluid and mosquito vectors. Am J Trop Med Hyg 54:72-76, 1996.

54. Sullivan U, Hembree SC. Enhancement of the density of circulating microfilariae with diethylcarbamazine. Trans R Soc Trop Med Hyg 64:787-788, 1970.

55. Turner P, Copeman B, Gerisi D et al. A comparison of the Og4C3 antigen capture ELISA, the Knott, and IgG4 assay and clinical signs in the diagnosis of bancroftian filariasis. Trop Med Parasitol 44: 45-48, 1993.

56. Wartman WB. Filariasis in American armed forces in World War II. Medicine 26:333-394, 1944.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

57. Weil GJ, Liftis F. Identification and partial characterization of a parasite antigen in sera from humans infected with *Wuchereria bancrofti*. J Immunol 138:3035-3041, 1987.

58. Weil GJ, Jain DC, Santhanam S et al. A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for detecting parasite antigenemia in bancroftian filariasis. J Infect Dis 156:350-355, 1987.

59. Weil GJ, Lammie PJ, Weiss N. The ICT filariasis test: A rapid-format antigen test for diagnosis of bancroftian filariasis. Parasitol Today 13:401-404, 1997.

60. Weingarten RJ. Tropical eosinophilia. Lancet 1:103-105, 1943.

61. Williams SA, Nicolas L, Lizotte M et al. Use of a polymerase chain reaction assay for the detection of *Wuchereria bancrofti* in blood samples from Tahit. Trans R Soc Trop Med Hyg 90:384-387, 1996.

62. Wong MM, Chong LK. Diurnal inducement of microfilariae into the peripheral blood by diethylcarbamazine. Med J Malaysia 21:383, 1967.

63. World Health Organization. Strategies for control of lymphatic filariasis infection and disease: report of a WHO/CTD/TDR consultative meeting held at the Universiti Sains Malaysia. Penang, Malaysia, 22-24 August 1994 (TDR/CTD/FIL/ PENANG/94.1).

64. Zhong M, Mccarthy J, Bierwert L et al. A PCR assay for detection of *Wuchereria bancrofti* in blood. Am J Trop Med Hyg 54:357-363, 1996.

65. Zimmerman PA, Guderian RH, Araujo E et al. Polymerase chain reaction-based diagnosis of *Onchocerca volvulus* infection: improved detection of patients with onchocerciasis. J Infect Dis 169:686-689, 1944.

© *Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.*

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte



SEÇÃO 5

Cultivo de Protozoários

"In vitro cultivation of protozoa is presently more an art than a science... To be successful in cultivating parasitic protozoa, or any cell or organism, one must have infinite patience, persistence and a willingness to devote countless hours... The cultivator must be observant, sensitive to the slightest alteration in behavior of the organisms and able to respond appropriately."

Diamond *et al.*, 1983

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Capítulo 20



Entamoeba histolytica

Geraldo Attilio De Carli

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A *E. histolytica*, agente da amebíase intestinal e hepática, pode ser cultivada em conjunto com bactérias encontradas nas fezes dos pacientes infectados. Em grego, *xenos* significa desconhecido. Quando as amebas crescem associadas com um microbiota desconhecido, a cultura é chamada xênica; se o organismo convive com uma única bactéria conhecida, a cultura é monoxênica. Quando a cultura contém várias bactérias identificadas, ela é polixênica. Entretanto, quando as amebas crescerem sem a presença de nenhuma bactéria, as culturas são axênicas. Cultivos axênicos de organismos são de inestimável valor para: a) estudos de bioquímica, fisiologia e metabolismo dos organismos com o objetivo de estabelecer as exigências nutricionais dos parasitos; b) produção de antígenos e anticorpos monoclonais e policlonais contra a *E. histolytica*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

para o diagnóstico sorológico, como também para outros estudos imunológicos; c) estudos diferenciais entre cepas patogênicas e não-patogênicas por meio da eletroforese de isoenzimas (zimodemos), anticorpos monoclonais e/ou pelas sondas de DNA; d) triagem de novos medicamentos *in vitro* para a identificação da suscetibilidade e resistência das cepas para um determinado princípio ativo; e) infecção de animais de laboratório para produzir a doença e poder entender o processo patológico; e f) conhecimento da organização do parasito em nível ultra-estrutural.

A correta identificação desse organismo é extremamente importante, porque a *E. histolytica* é a única produtora de doença entre as espécies das amebas entéricas. A classificação das espécies da *Entamoeba* está baseada, principalmente, no número de núcleos dos cistos maduros. Entretanto, são diagnosticadas nas fezes humanas outras espécies de cistos de amebas com quatro núcleos, tais como *Entamoeba dispar*, *Entamoeba hartmanni* e *Entamoeba histolytica* tipo Laredo. As características morfológicas diferenciam todas as amebas, com exceção de *E. histolytica*, *E. dispar* e *E. hartmanni*. A *E. histolytica* e a *E. dispar* são morfologicamente idênticas, com o mesmo tamanho, mas podem ser diferenciadas pela análise das isoenzimas.

Meio *Trypticase-Yeast Extract-Iron-Serum* (TYI-S-33)

O meio de Diamond, Harlow e Cunnick *(Trypticase-Yeast Extract-Iron-Serum* —TYI-S-33)[1,2] é provavelmente o mais usado para o crescimento axênico de *E. histolytica* e de outras espécies de *Entamoeba*, incluindo a *E. histolytica* tipo Laredo; *E. invadens*, de répteis carnívoros; *E. terripinae*, hospedeira de tartarugas; *Chrysemys elegans*; *E. barreti*, também parasito de tartarugas; *Chelydra serpentina* e *E. moshkovskii*, isolada de efluentes de água de esgoto tratados com plantas.

Cultivo Axênico

Amostra

1. O espécime consiste em fezes, muco ou na combinação de ambos. As amostras fecais devem ser frescas.

2. O tempo de colheita do material fecal influi de maneira direta no isolamento das amebas. As amostras devem ser inoculadas dentro de 24 horas após a passagem.

Reagentes

1. *Trypticase* (BBL)
2. Extrato de levedo (BBL)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

3. Glicose ($C_6H_{12}O_6$)
4. L-cisteína, cloridrato ($C_3H_7NO_2S.HCl$)
5. Ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$)
6. Cloreto de sódio (NaCl)
7. Hidrogenofosfato dipotássico anidro (K_2HPO_4)
8. Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)
9. Citrato férrico amoniacal

Caldo Nutritivo (TYI)

Trypticase (BBL)	20g
Extrato de levedo (BBL)	10g
Glicose	10g
L-cisteína, cloreto monoidratado	1g
Ácido ascórbico	0,2g
Cloreto de sódio	2g
Hidrogenofosfato dipotássico anidro	1g
Diidrogenofosfato de potássio	0,6g
Citrato férrico amoniacal	22,8mg
Água destilada-deionizada	870ml
pH 6,8	

Preparação

1. Dissolver NaCl, K_2HPO_4 e KH_2PO_4 em 600ml de água. Adicionar e dissolver os ingredientes remanescentes na ordem apresentada, *trypticase*, extrato de levedo, glicose, L-cisteína, ácido ascórbico e citrato férrico amoniacal. Completar o volume em 870ml. Ajustar o pH em 6,8 com NaOH 1M.

2. Clarificar o meio pela passagem através de papel-filtro Whatman n.º 1. Distribuir nos volumes requeridos (87ml, ou múltiplos, em frascos de *Erlenmeyer)*.

3. Autoclavar (121°C/15min). Deixar à temperatura ambiente.

4. Armazenar o caldo a -20°C até seis meses.

Observação: o *Trypticase* (BBL) e o extrato de levedo (BBL) podem ser substituídos por 30g de *Biosaste* (BBL).

Mistura de Vitaminas n.º 13

Esta mistura é uma modificação simplificada da descrita por Diamond, Harlow e Cunnick[2].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Solução 1

1. **Solução 1a** — Dissolver 40mg de niacina e 180mg de ácido p-aminobenzóico em água destilada-deionizada. Volume final: 125ml.

2. **Solução 1b** — Dissolver 40mg de nicotinamida; 40mg de cloreto de piridoxal; 80mg de piridoxina; 25mg de pantotenato de cálcio; 830mg de cloreto de colina; 125mg de inositol; 25mg de cloreto de tiamina e 12mg de vitamina B_{12} em água destilada-deionizada. Volume final: 125ml.

3. **Solução 1c** — Dissolver 25mg de riboflavina em água destilada-deionizada com o auxílio de NaOH 1M. Volume final: 450ml.

4. **Solução 1d** — Dissolver 30mg de ácido fólico em água destilada-deionizada, com o auxílio de NaOH 1M. Volume final: 450ml.

5. **Solução 1e** — Dissolver 30mg de biotina (vitamina H) em água destilada-deionizada com o auxílio de NaOH 1M. Volume final: 450ml.

6. **Mistura 1** — Combinar as soluções **1a, 1b, 1c, 1d** e **1e**.

Observações

1. O pH final das soluções deverá ser de 6,5-7,0.

2. Quando o pH é mais alto, as soluções tendem a se tornar turvas. Neste caso descartar as soluções.

3. A turvação da solução indica um excesso de NaOH nas preparações **1c**, **1d** ou **1e**.

Solução 2

1. **Solução 2a** — Dissolver 50ml do ácido dl-6,8-tióctico (forma oxidada) em álcool etílico (C_2H_6O) a 95%.

2. **Solução 2b** — Dissolver 5g de *Tween* 80, 30mg de menadiona hidrogenossulfito de sódio e 25mg de acetato a-tocoferol em água destilada-deionizada. Volume final: 200ml.

3. **Mistura 2** — Combinar as soluções **2a** e **2b**.

Solução 3 (Mistura de Vitaminas n.º 13)

1. Combinar as misturas 1 e 2 e completar o volume de 2.000ml com água destilada-deionizada.

2. Filtrar em membrana *Millipore* de 0,22µm de porosidade. Armazenar a -20°C ou a -70°C.

Observações: *****Diamond[5] raramente usa filtros com porosidade inferior a 0,45µm. A porosidade de 0,22µm é mais segura, mas pode determinar retenção de proteínas e, provavelmente, de outros componentes.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Meio Completo (TYI-S-33)

1. Adicionar assepticamente (em capela de segurança biológica de fluxo laminar vertical) para cada *Erlenmeyer* com 87ml de caldo TYI, 10ml de soro bovino inativado (56°C por 30min) e 2ml da mistura de vitaminas n.º 13. O pH final deve ser de 6,6 e a osmolaridade, 370 a 400mOsm/kg^{-1}.

2. Distribuir, em tubos com rosca (*screw-capped*) 16 x 125mm, nos volumes requeridos, completando 75% a 80% da capacidade total. Armazenar a 4°C protegido da luz.

3. Para o isolamento de novas culturas, testes de crescimento e estudos experimentais, usar o meio até 96 horas; para manutenção de culturas padrões, até 10 dias.

Inoculação e Cultivo

A seleção de cultura axênica como fonte de amebas para subculturas é de importância vital. Essa seleção é baseada nos seguintes critérios: a) meio claro, indicando a inexistência de microrganismo; b) a maioria das amebas aderidas à superfície do tubo ou agrupadas; c) amebas apresentando ativa formação de pseudópodes; entretanto, a locomoção não necessita ser evidente; d) poucas células gigantes multinucleadas (essas células aparentemente não se multiplicam e as cepas caracterizadas pela presença de numerosas células gigantes apresentam dificuldades para a manutenção); e e) raras amebas mortas, caracterizadas pelas granulações, citoplasma enrugado e margens irregulares.

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Vários tubos com o meio TYI-S-33 devem ser retirados do refrigerador (4°C), antes de serem inoculados e agitados, a fim de se obter uma perfeita homogeneização, permanecendo uma a duas horas à temperatura de 35°C para estabilizar a temperatura.

3. As culturas selecionadas são mergulhadas em banho de gelo por cinco a 10 minutos e invertidas várias vezes para desalojar e dispersar as amebas da superfície interna do tubo.

4. Inocular, assepticamente (em capela de segurança biológica de fluxo laminar vertical), 0,5 a 1ml da cultura em tubos com meio fresco. Inserir a mesma quantidade de inóculo nos meios líquidos, Brain Heart Infusion (BHI) e tioglicolato de sódio (teste de esterilidade). Incubar os tubos a 35°C, na posição inclinada (ângulo de 5° a 10°), com as tampas fortemente fechadas.

5. Com microscópio invertido (aumento de 100X), examinar os tubos para verificar a presença de amebas. Quando presentes, os organismos usualmente se fixam à parede dos tubos.

Quando o crescimento é pequeno e somente algumas amebas são observadas, deixar os tubos na posição vertical durante 30 minutos a 35°C. Com pipeta retirar no fundo do tubo de cultura 10ml do sedimento, transferindo-o para tubo com meio fresco.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

6. Quando o crescimento é pequeno, e somente algumas amebas são observadas entre os detritos, centrifugar os tubos (250 x *g*/10min), aspirar e descartar o líquido sobrenadante e transferir o sedimento para tubos com meio fresco. Incubar os tubos a 35°C, na posição inclinada (ângulo de 5° a 10°) com as tampas fortemente fechadas.

Observações

1. Os tubos ou os frascos devem ser cheios, como foi indicado na preparação do meio; pequenos ou grandes volumes de ar podem prejudicar o crescimento da ameba.

2. O extrato de levedo pode ser substituído por 30g de *Bisaste* (BBL cat. n.º 11862) e o *trypticase* por 20g de *casein digest peptone* (BBL n.º 97023). Usar somente a forma marrom do citrato férrico amoniacal (Mallinckrodt).

3. Os produtos biológicos usados na preparação do meio podem variar de um lote para outro; recomenda-se que uma amostra de cada novo lote seja testada rigorosamente antes de aceitar todo o lote.

4. As amebas crescem muito bem nos meios suplementados com soro bovino ou de cavalo.

Meio *Trypticase-Yeast Extract-Serum-Gastric Mucin* (TYSGM-9)

O meio *Trypticase-Yeast Extract-Serum-Gastric Mucin* (TYSGM-9) foi desenvolvido por Diamond, Harlow e Cunnick, em 1978, e modificado por Diamond, em 1982[2,3,11].

Cultivo Xênico

Reagentes

1. *Trypticase* (BBL 97023)
2. Extrato de levedo (BBL)
3. Cloreto de sódio (NaCl)
4. Hidrogenofosfato dipotássico anidro (K_2HPO_4)
5. Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)
6. Mucina gástrica (U.S. Biochemical Corp. #16025)
7. *Tween* 80
8. Amido de arroz
9. Solução salina a 0,85%
10. Soro bovino
11. Penicilina G potássica
12. Sulfato de estreptomicina
13. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

14. Acetato de sódio triidratado ($CH_3CO_2Na.3H_2O$)
15. Azul-de-metileno (CI 52015-Sigma) ($C_{16}H_{18}ClN_3S.3H_2O$)

Caldo Nutritivo (Meio Básico)

Trypticase	2g
Extrato de levedo	1g
Cloreto de sódio	7,5g
Hidrogenofosfato dipotássico anidro	2,8g
Diidrogenofosfato de potássio	0,4g
Água destilada-deionizada	970ml

• Dissolver NaCl, K_2HPO_4 e KH_2PO_4 em 600ml de água. Adicionar e dissolver os ingredientes remanescentes na ordem apresentada, *trypticase* e extrato de levedo. Completar o volume em 970ml. Armazenar o caldo a -20°C até seis meses[4,6,7,11].

Solução de* Tween *80 a 5%

1. Dissolver 5g de *Tween* 80 em 95ml de água destilada-deionizada (v/v). Filtrar em membrana de *Millipore* de 0,22µm de porosidade.

2. Distribuir a solução (em capela de segurança biológica de fluxo laminar vertical), assepticamente, em tubos com rosca (18 x 180mm), à razão de 10ml.

3. Armazenar a -20°C até 12 meses. Segundo Visvesvara[11] armazenar a solução a 4°C por não mais de um mês.

Solução Tamponada de Fosfato pH 7,2 (PBS n.º 8)

Cloreto de sódio	9,5g
Hidrogenofosfato dipotássico anidro	3,7g
Diidrogenofosfato de potássio	1,10g
Água destilada deionizada q.s.p.	1.000ml

• Dissolver os sais em água usando um misturador magnético (*vortex*). Autoclavar (121°C/15min). Armazenar o tampão à temperatura de refrigerador (3-5°C) até três meses.

Amido de Arroz

1. Distribuir 500mg de amido de arroz em vários tubos com rosca (16 x 125mm). Não apertar as tampas. Colocar os tubos na posição horizontal no forno para esterilização a seco.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Verificar se o amido de arroz está uniformemente distribuído na superfície dos tubos. Manter os tubos à temperatura de 150°C durante duas horas e 30 minutos.

3. Deixar esfriar à temperatura ambiente. Quando os tubos estiverem frios apertar as tampas. Armazenar à temperatura de laboratório até três meses.

Suspensão de Amido de Arroz

1. Adicionar assepticamente (em capela de segurança biológica de fluxo laminar vertical) 9,5ml de PBS n.º 8 estéril para cada tubo com rosca (16 x 125mm) com 500mg de amido de arroz.

2. Agitar vigorosamente ou usar um misturador *vortex* para manter a suspensão de amido de arroz uniforme no momento do uso.

Solução Estoque de Antibióticos

1. Em capela de segurança biológica de fluxo laminar vertical, com seringa descartável estéril com capacidade de 6ml com agulha de 20 *gauge*, adicionar 5ml de água destilada-deionizada em um frasco de penicilina G sódica (10^6UI).

2. Em fluxo laminar, com seringa descartável estéril com capacidade de 6ml com agulha de calibre 20 *gauge*, adicionar 5ml de água destilada-deionizada em um frasco de sulfato de estreptomicina (10^6µg/ml).

3. Agitar vigorosamente as soluções de antibióticos e deixar em repouso durante 30 minutos, para a dissolução completa em água.

4. Misturar os dois antibióticos, em frasco estéril, completando o volume de 125ml com água destilada-deionizada. A concentração da solução estoque é de 8.000UI/ml de penicilina e 8.000µg/ml de estreptomicina.

5. Filtrar em membrana de *Millipore* de 0,22µm de porosidade. Distribuir, assepticamente, o volume de 1ml do filtrado, em tubos com rosca (16 x 125mm). Armazenar a solução a -20°C por 12 meses (em caixas de criopreservação).

Solução Tamponada de Azul-de-Metileno

SOLUÇÃO A (SOLUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO A 0,2M)

Ácido acético	11,55ml
Água destilada-deionizada	988,45ml

• Em balão volumétrico, adicionar lentamente o ácido acético em água. Estocar a solução em frasco com tampa esmerilhada até um ano.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Solução B (Solução de Acetato de Sódio a 0,2M)

Acetato de sódio triidratado ($CH_3COONa.3H_2O$)	16,4g
Água destilada-deionizada	1.000ml

• Em balão volumétrico, dissolver o acetato de sódio em 400ml de água, completando o volume de 1.000ml, misturar bem e estocar em frasco com tampa esmerilhada até um ano.

Solução C (Tampão pH 3,6)

Solução A	46,3ml
Solução B	3,7ml
Água destilada-deionizada	100ml

• Misturar as soluções A e B em frasco volumétrico, levando o volume a 100ml com água destilada-deionizada, cujo pH deve ser 3,6. Estocar em frasco com tampa esmerilhada até um ano.

Corante Azul-de-Metileno

Azul-de-metileno	60mg
Tampão de acetato de sódio	100ml

• Dissolver o corante na solução tampão e estocar em frasco com tampa esmerilhada até um ano.

Preparação do Meio Completo

1. Distribuir 200mg de mucina gástrica em frascos com rosca com capacidade para 125ml ou em frascos de *Erlenmeyer*.

2. Adicionar 97ml (alguns autores adicionam 96ml) do caldo nutritivo (meio básico) para cada frasco.

3. Autoclavar (121°C/15min) para solubilizar a mucina e esterilizar o meio. Deixar esfriar à temperatura ambiente.

4. Adicionar, assepticamente, 5ml de soro bovino em fluxo laminar vertical (estéril e inativado, a 56°C/30min) e 0,1ml de solução de *Tween* 80 a 5% (alguns autores usam 3ml de soro bovino e 0,05ml de solução de *Tween* 80 a 5%).

5. Agitar vigorosamente o meio para manter as partículas de mucina em suspensão. Distribuir, assepticamente, 8ml do meio em tubos com rosca (16 x 125mm) em capela de segurança biológica de fluxo laminar vertical. Armazenar os tubos a 4°C por não mais do que um mês.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

6. Quando os espécimes fecais são inoculados, adicionar 2 a 3mg/ml (ou 0,25ml) da suspensão de amido de arroz. Quando a cultura começar a se estabelecer, usar somente a metade da quantidade da suspensão de arroz.

7. Incubar os tubos a 37°C durante 24 horas para teste de esterilidade, sendo, após, estocados à temperatura de 4°C, até um mês.

Inoculação e Cultivo

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Antes de serem inoculados, vários tubos com o meio básico são agitados para que se obtenha uma perfeita homogeneização, permanecendo uma a duas horas à temperatura de 35°C para estabilizar a temperatura do meio.

3. Adicionar, assepticamente em capela de segurança biológica de fluxo laminar vertical, 0,1ml da solução estoque de antibióticos. A concentração final de antibióticos é de 100UI/ml de penicilina G potássica e 100µg/ml de sulfato de estreptomicina.

4. Agitar vigorosamente os tubos e, assepticamente, adicionar três gotas da suspensão de amido de arroz para cada tubo com o meio.

5. Emulsificar 50mg de fezes (tamanho de pequena ervilha) em 1 a 2ml de solução salina a 0,85% estéril e adicionar uma pequena alíquota em cada tubo.

6. Incubar os tubos a 35°C por 48 horas com as tampas fortemente fechadas. Estocar os tubos durante a incubação com posição inclinada (ângulo de 45° a 50°).

Exame das Culturas

Com microscópio invertido (aumento de 100X), examinar os tubos para verificar a presença de amebas. Quando presentes, os organismos usualmente se fixam nas paredes internas dos tubos entre o material fecal e o amido de arroz. Freqüentemente, é necessário inverter cuidadosamente os tubos para dispersar o material fecal e o amido de arroz que encobrem as amebas. Quando o laboratório não possuir microscópio invertido adotar a seguinte rotina:

1. Deixar os tubos na posição vertical durante 30 minutos a 35°C.

2. Com uma pipeta estéril, retirar cerca de 0,5ml do sedimento no fundo do tubo e colocar uma ou duas gotas do sedimento nas extremidades de uma lâmina de microscopia.

3. Misturar uma gota da solução de azul-de-metileno com o sedimento. Cobrir as preparações com uma lamínula (18 x 18mm). Observação microscópica com aumentos de 40X e 100X.

4. Quando não são observadas amebas, deixar os tubos na posição vertical durante 30 minutos a 35°C.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

5. Com pipeta de Pasteur, retirar do fundo de cada tubo de cultura todo o sedimento, transferindo o sedimento para tubos com meio fresco contendo amido de arroz e antibióticos.

6. Incubar os tubos a 35°C por 48 horas com as tampas fortemente fechadas. Estocar os tubos durante a incubação com posição inclinada (ângulo de 45° a 50°).

7. Com microscópio invertido (aumento de 100X), examinar os tubos para verificar a presença de amebas. Descartar os tubos se não for observada a presença de amebas. Reportar o resultado como negativo.

Subculturas

1. Quando as amebas estiverem presentes em pequeno número, resfriar os tubos em banho de gelo por cinco minutos e centrifugar (250 x *g*/5min). Aspirar e desprezar o sobrenadante.

2. Inocular o sedimento em tubos com meio completo fresco.

3. Quando as amebas estiverem presentes em grande número, deixar os tubos na posição vertical por 30 minutos e remover 0,2ml do sedimento no fundo do tubo. Inocular o sedimento em tubos com meio completo fresco, ou:

a. Resfriar os tubos em banho de gelo por 10 minutos.

b. Inverter os tubos várias vezes, para não perder as amebas fixadas às paredes internas dos tubos e centrifugar (275 x *g*/3min).

c. Aspirar e desprezar o sobrenadante. Ressuspender o sedimento, transferindo-o para 1ml de meio completo fresco. Inocular 0,5ml da suspensão (sedimento + meio completo) para dois tubos com meio completo fresco.

d. O crescimento melhora com sucessivas subculturas, diminuindo a quantidade do inóculo nas novas subculturas. As transferências aos meios frescos devem ser realizadas a cada 48 horas.

e. Quando as culturas estiverem ótimas, as subculturas podem ser realizadas sem a centrifugação.

f. Resfriar os tubos em banho de gelo (10 minutos), inverter várias vezes, colher material para a subcultura diretamente do tubo, subinocular, 1,5ml do meio, três vezes por semana.

Observações

1. As culturas para E. *histolytica* podem ser iniciadas com cistos ou com trofozoítos.

2. O crescimento bacteriano, grande problema nas culturas, pode ser controlado pela adição de penicilina e estreptomicina em várias concentrações, dependendo dos microrganismos isolados.

3. *O Blastocystis hominis* pode ser eliminado das culturas pelo uso de acriflavina (2,5 a 10μg/ml).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Meio de Balamuth

O meio de Balamuth *(Balamuth's aqueous egg yolk infusion medium)* é indicado para detectar a presença de amebas. Os reagentes específicos requerem tampão de fosfato e solução concentrada de fígado[8].

Reagentes

1. Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)
2. Fosfato tribásico de potássio (K_3PO_4)
3. Extrato concentrado de fígado (Difco ou BBL)
4. Cloreto de sódio (NaCl)
5. Ovos de galinha

Solução Tampão de Fosfato

Solução A

Fosfato tribásico de potássio	212,27g
Água destilada-deionizada	1.000ml

Solução B

Diidrogenofosfato de potássio	136,09g
Água destilada-deionizada	1.000ml

• Misturar as soluções A (três partes) e B (duas partes). Antes do uso, diluir a solução tampão para 0,067M (adicionar 492ml de água destilada-deionizada para um litro de solução tampão de fosfato).

Solução Concentrada de Fígado

Extrato concentrado de figado em pó	5g
Água destilada-deionizada	100ml

• Dissolver o extrato de fígado concentrado em água destilada quente e autoclavar (121°C/15min). O sedimento é removido pela filtração do meio em funil de *Büchner*. Distribuir nos volumes requeridos (10ml) e autoclavar (121°C/15min).

Preparação do Meio

1. Misturar as gemas de 12 ovos frescos (aferventados) com 375ml de solução de cloreto de sódio a 0,8%.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Autoclavar (121°C/10min), deixar esfriar e agitar a mistura.

3. Autoclavar novamente (121ºC/7min).

4. Deixar esfriar e adicionar a quantidade necessária de água destilada-deionizada para completar o volume inicial (perda pela evaporação). Transferir a mistura para um saco de musselina. Forçar, com cuidado, a passagem do líquido através da membrana de musselina, usando pressão regular e contínua. Recolher o filtrado em proveta. Ajustar o volume inicial (375ml) com solução de cloreto de sódio a 0,8%.

5. Autoclavar (121°C/20min) e esfriar a 5°C. Não agitar o líquido nesta fase da preparação ou durante a filtração.

6. Filtrar no funil de *Büchner* com papel-filtro (Whatman n.º 3). Trocar o papel-filtro quando houver necessidade.

7. Medir o filtrado e adicionar o mesmo volume de solução tampão de fosfato 0,067M. Autoclavar (121°C/20min). Antes do uso, suplementar o meio com a solução concentrada de fígado (uma parte da solução concentrada para nove partes do meio). Armazenar o meio completo à temperatura de 4-5°C.

8. Em condições de assepsia total, distribuir o meio em tubos com rosca 15 x 180mm, à razão de 6 a 8ml por tubo. Incubar o meio completo à temperatura de 37°C durante quatro dias para teste de esterilidade.

Inoculação

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. A cada tubo, antes da inoculação, adicionar uma pequena porção (pitada) de farinha de arroz ou amido estéril.

3. Inocular aproximadamente 30mg de material fecal, muco ou a combinação dos dois materiais orgânicos no tubo e incubar a 37°C.

4. Examinar ao microscópio óptico durante quatro dias, com leituras diárias, 0,1ml do sedimento para a presença da mobilidade característica das amebas.

5. Apesar das culturas iniciais serem negativas, as subculturas podem revelar o organismo.

Meio de Boeck and Drbohlav *Locke-Egg-Serum* (LES)

O meio de Boeck and Drbohlav's *Locke-Egg-Serum* (LES) é usado para o isolamento de amebas[8].

Reagentes

1. Cloreto de sódio (NaCl)
2. Hidrogenocarbonato de sódio ($NaHCO_3$)
3. Cloreto de potássio (KCl)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

4. Cloreto de cálcio ($CaCl_2$)
5. Glicose ($C_6H_{12}O_6$)
6. Álcool etílico a 70% (C_2H_6O)
7. Ovos de galinha

Solução de Locke

Cloreto de sódio	9g
Hidrogenocarbonato de sódio	0,2g
Cloreto de potássio	0,42g
Cloreto de cálcio	0,25g
Glicose	2g
Água destilada-deionizada	1.000ml

• Dissolver o $CaCl_2$ em pequena quantidade de água e após adicionar os sais remanescentes. Autoclavar antes de armazenar.

Meio Completo

1. Lavar com álcool a 70% a casca de quatro ovos frescos, os quais são quebrados em um frasco estéril com pérolas de vidro.

2. Adicionar à mistura 50ml da solução de Locke. Agitar até a completa homogeneização.

3. Distribuir o meio em frascos com rosca, à razão de 2,5 a 4cm, para que se produza uma inclinação no fundo do tubo.

4. Fechar os tubos colocando-os em posição inclinada em coagulador à temperatura de 70°C até que a porção inclinada do meio se solidifique.

5. Autoclavar os tubos (121°C/20min). Desprezar aqueles que apresentarem rachaduras na porção inclinada do meio.

6. Preparar uma mistura com oito partes da solução de Locke e uma parte de soro humano inativado (56°C/30min). Esterilizar a mistura por filtração.

7. Incubar a 37°C durante dois a três dias, para teste de esterilidade. Cobrir a inclinação do meio com aproximadamente 1cm de solução estéril. A cada tubo, antes da inoculação, adicionar uma pequena porção (pitada) de farinha de arroz ou amido estéril.

8. Inocular aproximadamente 30mg de material fecal, muco ou a combinação dos dois materiais orgânicos no tubo e incubar a 35°C.

9. Examinar ao microscópio óptico, durante quatro dias, com leituras diárias, 0,1ml do sedimento para a presença da mobilidade característica das amebas.

10. Apesar das culturas iniciais serem negativas, as subculturas podem revelar o organismo.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Controle de Qualidade: TYSGM-9 e TYI-S-33

1. Controlar semanalmente e sempre que forem usadas as soluções n.º 8 de PBS, suspensão de amido de arroz, solução de *Tween* 80 e meios TYSGM-9 e TYI-S-33.

a. Os meios não devem apresentar sinais de precipitação e nenhuma contaminação visível por bactérias e/ou fungos.

b. As soluções n.º 8 de PBS, *Tween* 80 e suspensão de amido de arroz devem estar claras, sem sinais visíveis de contaminação.

2. Manter culturas-padrão de *E. histolytica* (ATCC 30.925 [cepa HU-1 CDC] e ATCC 30.015 [cepa HK-9] a 35ºC), e as cepas *E. histolytica* tipo *Laredo* (ATCC 30.042) *e E. moshkovskii* em cultura a 25°C.

a. Transferir a cultura-padrão (ATCC 30.925) em dias alternados para o meio TYGM-9. Uma vez por mês transferir e manter a cultura padrão a 25°C.

b. Transferir a cultura-padrão (ATCC 30.015) uma vez a cada três dias para o meio TYIS-33.

c. Os trofozoítos em cultura medem 10 a 60μm. Geralmente têm um só núcleo pouco visível nas formas vivas. O exame a fresco mostra formas pleomórficas ativas, alongadas, com emissão contínua e rápida de pseudópodes, grossos e hialinos; costumam imprimir movimentação direcional, parecendo deslizar na superfície. O núcleo é pequeno e usualmente com localização central, mas pode ser excêntrico. Os cistos não são usualmente encontrados nas culturas.

3. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. Colocar as objetivas e as oculares originais no microscópico durante a calibração.

4. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados. Quando necessário, seguir plano de ação para resultados "fora de controle"[11].

Meio de Robinson

O meio difásico de Robinson[9] manteve-se ignorado, até que Sargeaunt e Williams[10] restabeleceram o seu uso para o isolamento e manutenção de protozoários do gênero *Entamoeba* nos estudos das isoenzimas. No meio de Robinson, podem ser cultivados os seguintes enteroparasitos do homem: *E. histolytica*, *E. hartmanni*, *E. coli*, *Endolimax nana*, *Dientamoeba fragilis*, *Iodamoeba bütschlii*, *Thrichomonas hominis* e *Balantidium coli*[4,5,8,9].

Cultivo Xênico

Preparação do Meio de Cultura

Ágar Salina Inclinado

1. Dissolver pelo aquecimento em água destilada-deionizada, 15g de ágar (Bacto Agar) e 7g de cloreto de sódio (NaCl).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Distribuir 2,5ml do meio em tubos com rosca (*screw-capped*) 45 x 15mm. Autoclavar (121°C/15min).

3. Inclinar para solidificar em bisel.

Solução de Eritromicina

1. Dissolver em um frasco estéril, 0,5g de eritromicina em 20ml de álcool etílico (C_2H_6O).

2. Deixar à temperatura de 4°C por duas horas ou mais, e completar o volume de 30ml com água.

Bacto-Peptona (Difco)

1. Dissolver 20g de Bacto-peptona (Difco) em água destilada-deionizada.

2. Autoclavar (121°C/15min).

Amido de Arroz

Fornecido pela Difco. Usar sem esterilizar.

Solução de Hidrogenoftalato

1. Dissolver 204g de hidrogenoftalato de potássio ($C_8H_5KO_4$) em 1.800ml de água destilada-deionizada.

2. Ajustar o pH em 6,3 com solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 40% (m/v). Completar o volume a 2.000ml.

3. Distribuir em tubos com rosca à razão de 10ml por tubo.

4. Autoclavar (121°C/15min).

5. Diluir esta solução estoque (0,5M) na proporção de 1:10 com água destilada-deionizada estéril. Solução de trabalho 0,05M, pH 6,5.

Soro(S)

1. Clarificar o soro no filtro de *Büchner* pela passagem em papel.

2. Esterilizar em *Seitz*.

3. Inativar a 56°C em três dias sucessivos e estocar a 4°C. Robinson[8] usou soro de ovino; entretanto, relata que pode ser usado soro fresco ou inativado, estéril, ou contaminado de diversas espécies animais (coelho, cavalo, bovino, ovelha ou humano).

Meio Definido (R) para Crescimento de *Escherichia coli*

Reagentes

1. Cloreto de sódio (NaCl)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Ácido cítrico monoidratado ($C_6H_8O_7.H_2O$)
3. Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)
4. Sulfato de amônio ($[NH_4]_2SO_4$)
5. Sulfato de magnésio heptaidratado ($MgSO_4.7H_2O$)
6. Ácido láctico (pureza 90%) ($C_3H_6O_3$)

A. Solução Estoque

Cloreto de sódio	125g
Ácido cítrico monoidratado	50g
Diidrogenofosfato de potássio	12,5g
Sulfato de amônio	25g
Sulfato de magnésio heptaidratado	1,25g
Ácido láctico (pureza 90%)	100ml
Água destilada-deionizada	2.500ml

• Armazenar em frasco não esterilizado com tampa esmerilhada.

B. Solução de Trabalho

1. Adicionar 100ml da Solução Estoque em 850ml de água destilada deionizada.
2. Ajustar o pH em 7,0 com NaOH a 40% (m/v).
3. Distribuir 25ml do meio, em frascos com rosca *(screw-capped)*, com capacidade de 100ml, tendo um dos lados plano.
4. Autoclavar (121°C/15min)[7].

Meio Basal para Ameba (BR)

Inocular a *Escherichia coli* em 25ml de Solução de Trabalho em frascos com rosca *(screw-capped)* com um dos lados planos. Incubar por 48 horas a 37°C.

Meio Completo para Ameba (BRS)

Adicionar volume igual de soro ao meio basal para ameba (BR) e continuar a incubação por mais 24-48 horas.

A. Isolamento de Ameba

1. Adicionar, no tubo com rosca contendo o ágar salina inclinado, 10g de amido de arroz, 0,12ml de solução de eritromicina, e meio basal para ameba

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

(BR), o suficiente para cobrir o bisel. O tubo não deve ficar completamente cheio. Inocular aproximadamente 50mg de fezes no frasco, fechar e incubar a 35°C por 24 horas.

2. Aspirar e descartar o sobrenadante, deixando somente o amido e as fezes. Repor o sobrenadante com meio completo para ameba (BRS) diluído 1:4 com solução de hidrogenoftalato, o suficiente para cobrir o bisel de ágar salina inclinado.

3. Adicionar ao meio 0,06ml de eritromicina; 0,06ml de solução de Bacto-peptona e amido de arroz. Incubar por 24 horas. Após, remover uma gota de fezes e amido do fundo do frasco e misturar com uma gota de solução de iodo.

4. Examinar ao microscópio óptico para a presença de ameba. Se não for encontrada ameba, adicionar amido de arroz, se necessário, e continuar a incubação da cultura por mais 48 horas. Após, reexaminar.

Subcultura

Transferir 0,1ml da camada fecal-amido para um novo tubo contendo ágar salina inclinado com BRS diluído em 1:4 com solução de hidrogenoftalato, eritromicina, Bacto-peptona e amido de arroz, como indicado acima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Diamond LS. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and E. histolytica-like amebac. J Parasitol 54:1047, 1968.
2. Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans R Soc Trop Med Hyg 72:431-432, 1978.
3. Diamond LS. A new medium for xenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other lumen dwelling protozoa. J Parasitol 68:958, 1982.
4. Diamond LS. Lumen dwelling protozoa: *Entamoeba*, trichomonads, and *Giardia* In: Jensen JP, ed. In vitro Cultivation of Protozoan Parasites. Boca Raton (Fla): CRC Press, p. 65-109, 1983.
5. Diamond LS. *Entamoeba*, *Giardia* and *Trichomonas*. In: Taylor ERA, Baker JR, eds. In vitro Methods for Parasite Cultivation. New York: Academic Press p.1-28, 1987.
6. Diamond LS. Lumen dwelling protozoa: *Entamoeba*, *Trichomonas*, and *Giardia*. In: Jensen JP, ed. In vitro Cultivation of Protozoa Parasites. Boca Raton (Fla): CRC Press, p. 365-109, 1987.
7. Diamond LS. *Entamoeba*, *Giardia* and *Trichomonas*. In: Taylor ERA, J.R. Baker JR, eds. In vitro Methods for Parasite Cultivation. New York: Academic Press; p. 1-28, 1987.
8. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3nd ed. Washington (DC): ASM Press, 1997.
9. Robinson GL. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. Trans R Soc Trop Med Hyg 62:285-294, 1968.
10. Sargent P, Williams JE. Electrophoretic isoenzyme patterns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba coli*. Trans R Soc Trop Med Hyg 72:164, 1978.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

11. Visvesvara GS. Parasite Culture: *Entamoeba histolytica*. In: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington, DC: ASM Press p. 7.9.1.1-791.8, v.2, 1992.

SUGESTÕES PARA LEITURA

1. Albach RA, Shaffer JG, Watson RH. A comparison of in vitro drug sensivites of strains of *Entamoeba* which grow at 37°C and at room temperature. Am J Trop Med Hyg 15:855-859, 1966.
2. Battacharya S, Battachaya A, Diamond LS. Comparison of repeated DNA from strains of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Mol Biochem Parasitol. 27:257-262, 1988.
3. De Carli GA, Rott MB. Amebas e amebose: permanente confusão. RBAC 27:65-67, 1995.
4. Dobell C. The amoebae living in man. Zoological Monograph. New York: Willian Wood and Company, 1919.
5. Elsdon-Dew R. The epidemiology of amoebiasis. Adv Parasitol 1968;6:1. Garfinkel LI, Giladi M, Huber M et al. DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* prossessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes. Infect. Immun 57:926-931, 1989.
6. López-Revilla R, Gómez-Domingues R. Trophozoite and nuclear size. DNA base composition, and nucleotide sequence homology of several *Entamoeba* strains in axenic culture. Parasitol Res 74:424-430, 1988.
7. Neal RA. Experimental studies on *Entamoeba* with reference to speciation. Adv Parasitol 4:1-5 1, 1966.
8. Ravdin JI. Amebiasis Human Infection by *Entamoeba histolytica*. New York: John Wiley &. Sons, 1988.
9. Richards CS, Goldman M, Cannon LT. Cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba histolytica-like* strains at reduced temperature and behavior of the amebae in diluted media. Am J Trop Med Hyg 15:648-655, 1966.
10. Rosas GA, Najarian HH. Infectivity studies on the Laredo strain of *Entamoeba histolytica.* Tex Rep Biol Med 23:507-511, 1965.
11. Samuelson J, Acuna-Soto R. Reed S et al. DNA hybridization probe for clinical diagnosis of *Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol 27:671-676, 1989.
12. Sargeaunt P, Williams JE, Neal RA. A comparative study of *Entamoeba histolytica* (NIH:200, HK-9 etc.) "*E. histolytica-like*" and other morphologically identical amoebae using isoenzyme eletrophoresis. Trans R Soc Trop Med Hyg 74:469-474, 1980.
13. Sargeaunt P, Williams JE. Electrophoretic isoenzyme patterns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba coli*. Trans R Soc Trop Med Hyg 72:164, 1982.
14. Sargeaunt P, Williams JE, Bhojnani R et al. A review of isoenzyme characterization of *Entamoeba histolytica* with particular reference to pathogenic and nonpathogenic stocks isolated in Mexico. Arch Invest Med 13(Suppl):89-94, 1982.
15. Walsh JA. Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. In: Ravin JI, ed. Amebiasis: Human infection by *Entamoeba histolytica*. New York: John Wiley & Sons; p. 93-105, 1988.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Capítulo 21



Amebas de Vida Livre

Geraldo Attilio De Carli
Hércules Moura

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As amebas de vida livre (AVL) são protozoários naturalmente encontrados em coleções de água doce, solo úmido, esgoto e ar. Os membros dos gêneros *Acanthamoeba, Balamuthia* e *Naegleria* são responsáveis por casos de infeção humana, muitos deles fatais. A espécie *Naegleria fowleri* é reconhecida como o agente da meningoencefalite amebiana primária (MEAP), infecção que acomete jovens e é quase sempre fatal. Espécies dos gêneros *Acanthamoeba* e *Balamuthia* são agentes da encefalite granulomatosa amebiana (EGA). Além da EGA, a *Acanthamoeba* produz quadros clínicos muito diversos, principalmente a ceratite amebiana (CA), que são lesões ulceradas da córnea. *Naegleria* e *Acanthamoeba* podem ser facilmente cultivados em laboratório, igualmente em cultura monoxênica (com uma única espécie de bactéria no meio) ou axênica (sem a presença de bactérias no meio), enquanto a *Balamuthia*, por ser mais exigente, cresce melhor em culturas de células. Quando o agente etiológico está localizado no sistema nervoso central (SNC) ou em outro fluido orgânico, não podendo ser identificado, é imperativo a tentativa de cultura dos organismos suspeitos de encefalite amebiana (Tabela 21.1). As culturas são indicadas como uma tentativa para esclarecer os casos para os quais o diagnóstico presuntivo foi realizado, tomando como base as características morfológicas do agente suspeito, já que esses organismos podem ser confundidos com células dos hospedeiros.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Tabela 21.1
Comparação da *Naegleria fowleri* e *Acanthamoeba* spp.[2]

Característica	*Naegleria fowleri*	*Acanthamoeba* spp.
Trofozoíto	Bifásico (formas amebóide e flagelada) medindo 8-15μm, forma amebóide com pseudópodes do tipo lobópode	Amebas grandes (15-25μm); movimentação lenta através de pseudópodes típicos (acantopódios)
Cistos	Ausentes nos tecidos; pequenos, lisos e redondos	Presentes nos tecidos; grandes (15 a 20μm) com dupla parede cística rugosa
Crescimento em cultura	Requer células vivas (bactérias ou cultura de células) não cresce > 0,4% de NaCl	Pode crescer sem bactérias; não é afetada pelo NaCl a 0,85%
Aparência nos tecidos	Menor do que a *Acanthamoeba* spp.; endoplasma denso, coloração nuclear não diferenciada	Grande, arredondada, menos endoplasma, coloração do núcleo mais diferenciada

O cultivo axênico dos organismos é de inestimável valor para: a) estudos bioquímicos, fisiológicos e do metabolismo para determinar as exigências nutricionais; b) produção de massa de antígenos, que serão úteis para o diagnóstico sorológico e para a produção de anticorpos monoclonais e policlonais para estudos imunológicos; c) diferenciação das espécies do gênero pelo uso da eletroforese das isoenzimas, anticorpos monoclonais e/ou de sondas de DNA; d) triagem de medicamentos para estabelecer a sensibilidade e a resistência dos organismos em relação aos fármacos que possam ser utilizados na quimioterapia; e) infectar animais de experimentação para estudar e entender os processos que envolvem a doença; e f) conhecer a organização ultra-estrutural do parasito[3,4,5].

AMOSTRAS

1. Para *Acanthamoeba*, *Balamuthia* e *Naegleria* spp. os espécimes consistem em líquido cefalorraquidiano (LCR), biópsia ou autópsia dos tecidos do cérebro, e para a *Acanthamoeba*, biópsia ou autópsia dos pulmões; raspados ou biópsia da córnea; material colhido de lentes de contato e de objetos de uso pessoal, tais como soluções e estojos para lentes de contato; material de abscessos da pele; supuração dos ouvidos ou fezes, que também podem ser usadas.

2. Solo e amostras de água podem ser usadas para o isolamento dessas pequenas AVL.

3. Os melhores resultados com a cultura são obtidos quando as amostras são processadas imediatamente após a colheita ou dentro de 24 horas. O tempo entre a colheita e a inoculação é de vital importância para o LCR e o material dos tecidos.

4. As amostras não devem ser congeladas, mas podem ser resfriadas.

5. Quando as amostras podem ser processadas dentro de quatro a oito horas, mantê-las à temperatura ambiente (24°C) até a realização do exame.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

6. As amostras devem ser colhidas e armazenadas em recipientes estéreis.

7. Coletar no mínimo 100ml de água para o isolamento de amebas. O recipiente deve ser suficientemente grande para que tenha ar em abundância.

Cultura em Placa de Ágar

Reagentes

1. Ágar (Difco)
2. Cloreto de sódio (NaCl)
3. Sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$)
4. Hidrogenofosfato dissódico anidro (Na_2HPO_4)
5. Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)
6. Cloreto de cálcio ($CaCl_2.2H_2O$)

Meio de Page (Solução Salina para Ameba)[1,5,6]

Cloreto de sódio	120mg
Sulfato de magnésio	4mg
Hidrogenofosfato dissódico anidro	142mg
Diidrogenofosfato de potássio	136g
Cloreto de cálcio	4g
Água destilada-deionizada	1.000ml

Preparação

1. Dissolver os ingredientes em água destilada-deionizada na ordem apresentada em recipiente apropriado.

2. Distribuir nos volumes requeridos (100ml) em 10 frascos de vidro.

3. Autoclavar (121°C/15min). Incubar o meio durante a noite, a 37°C, para teste de esterilidade.

4. Armazenar o meio à temperatura de 4-5°C até três meses.

Ágar Não-Nutritivo

Solução salina de Page	100ml
Ágar (Difco)	1,5g

Preparação das Placas

1. Dissolver o ágar em 100ml na solução salina de Page, aquecer em banho de água até a completa dissolução.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Distribuir o meio em tubos com rosca (*screw-capped*) 20 x 150mm, à razão de 20ml por tubo.

3. Autoclavar (121°C/15min). Incubar o meio durante a noite, a 37°C, para teste de esterilidade.

4. Armazenar o meio à temperatura de 4-5°C até 12 meses.

5. Quando necessário, fundir o ágar não-nutritivo, deixar esfriar a 60°C e distribuir em condições de assepsia total em placas de Petri de plástico (20ml para placas de 100 x 15mm ou 5ml para placas de 60 x 15mm).

6. Armazenar as placas à temperatura de 4-5°C até três meses.

Cultura Monoxênica (Inoculação)

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Retirar as placas de ágar não-nutritivo do refrigerador e deixar 30 minutos à temperatura de 37°C para estabilizar a temperatura do meio.

3. Adicionar 0,5ml da solução salina para ameba aos tubos com cultura de 18 a 24 horas de *Escherichia coli* ou de *Enterobacter aerogenes*. Com alça de platina raspar gentilmente a superfície inclinada do meio, procurando não romper o ágar. Aspirar o sobrenadante com pipeta de Pasteur e, imediatamente após, adicionar duas a três gotas dessa suspensão no centro da placa com ágar não-nutritivo (com a temperatura do meio já estabilizada). Com alça de platina espalhar as bactérias na superfície do meio.

4. Inocular as amostras no centro das placas com ágar não-nutritivo como segue:

a. Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

Centrifugar o LCR a 250 x *g*/10min. Com pipeta estéril transferir 0,5ml do sobrenadante a um tubo com rosca e armazenar à temperatura de 4°C. Ressuspender o sedimento com o restante do sobrenadante. Assepticamente, com pipeta de Pasteur, transferir duas a três gotas da suspensão para o centro da placa com ágar não-nutritivo previamente inoculada com bactérias. Depois que a suspensão foi absorvida, selar as placas com Parafilm® e incubar a 37°C.

b. Tecido

Triturar pequena porção de tecido (cérebro, pulmão, abscesso da pele, biópsia da córnea ou amostras similares) em aproximadamente 0,5ml de solução salina para ameba. Proceder como foi descrito acima. Material de lesões da córnea e secreção dos ouvidos, entre outros, podem ser inoculados diretamente na superfície do ágar como foi descrito anteriormente (etapa 3a).

c. Amostra de Água

Amostras de água (10 a 100ml) podem ser usadas para isolar amebas.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Inicialmente, filtrar as amostras de água através de gaze estéril dobrada três vezes para remover folhas, sujeiras etc. Após: a) filtrar as amostras através de membrana filtrante de acetato de celulose de 47mm de diâmetro e 5μm de porosidade em porta-filtro; retirar a membrana filtrante, colocando-a sobre o centro da placa com ágar não-nutritivo (com a temperatura do meio já estabilizada) e previamente inoculada com bactérias. Selar as placas com Parafilm® e incubar a 37°C; ou b) centrifugar a amostra de água (250 x *g*/10min), aspirar o sobrenadante, ressuspender o sedimento em aproximadamente 0,5ml de solução salina para ameba, depositando essa suspensão no centro da placa com ágar não-nutritivo (com a temperatura do meio já estabilizada) previamente inoculada com bactérias. Selar as placas com Parafilm® e incubar a 37°C.

d. Solo

Misturar aproximadamente 1g de solo com suficiente solução salina para ameba (0,5 a 1ml) para obter uma suspensão bem espessa. Inocular a suspensão no centro da placa com ágar não-nutritivo (com a temperatura do meio já estabilizada) previamente inoculada com bactérias. Selar as placas com Parafilm® e incubar a 37°C.

e. Solução para Lentes de Contato

Pequenos volumes (1 a 2ml) podem ser inoculados diretamente no meio com ágar não-nutritivo e previamente inoculado com bactérias. Inocular o sedimento no centro da placa com ágar não-nutritivo (com a temperatura do meio já estabilizada) e previamente inoculada com bactérias. Selar as placas com Parafilm® e incubar a 37°C.

Exame das Placas

1. Examinar diariamente durante 10 dias ao microscópio óptico (de preferência microscópio invertido) a presença de amebas (trofozoítos e cistos). Trilhas finas podem ser vistas na superfície do ágar (áreas onde as amebas ingeriram as bactérias).

2. Quando as amebas são observadas e identificadas, marcar a área, com lápis de cera, com um círculo.

3. Remover o Parafilm® (em capela de segurança biológica de fluxo laminar vertical), abrir a tampa da placa de Petri e, cuidadosamente, cortar a área marcada na superfície do ágar com espátula previamente aquecida até a incandescência e após resfriada. Transferir o pedaço de ágar com a face voltada para baixo ao centro da placa com ágar não-nutritivo (com a temperatura do meio já estabilizada) e previamente inoculada com bactérias. Selar as placas com Parafilm® e incubar a 37°C.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Observações

1. Os organismos *Acanthamoeba* spp. e *Naegleria* spp. podem ser cultivados como foi descrito anteriormente; já *Balamuthia*, por crescer melhor em culturas de células, dificilmente será isolada quando utilizados os procedimentos citados.

2. As amebas começam a sofrer desencistamento depois de dois a três dias; conseqüentemente, trofozoítos e cistos podem ser encontrados.

Meio *Proteose Peptone*-Extrato de Levedo-Glicose (PYG) para *Acanthamoeba* spp., pH 6,5 ± 0,2

Reagentes

1. Extrato de levedo (Difco)
2. *Proteose peptone* ou *Gelysate* (digesto pancreático de gelatina)
3. Sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$)
4. Cloreto de cálcio ($CaCl_2.2H_2O$)
5. Citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$)
6. Sulfato ferroso amoniacal [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$]
7. Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)
8. Hidrogenofosfato dissódico anidro (Na_2HPO_4)
9. Meio de Page (solução salina para ameba)
10. Glicose ($C_6H_{12}O_6$)
11. Penicilina G potássica
12. Sulfato de estreptomicina

Meio *Proteose Peptone*-Extrato de Levedo-Glicose (PYG), pH 6,5 ± 0,2[6]

Proteose peptone (BBL ou Difco)	20g
Extrato de levedo (Difco)	2g
Sulfato de magnésio	0,98g
Cloreto de cálcio	0,059g
Citrato de sódio	1g
Sulfato ferroso amoniacal	0,02g
Diidrogenofosfato de potássio	0,34g
Hidrogenofosfato dissódico anidro	0,355g
Glicose	18g
Água destilada-deionizada	1.000ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Preparação

1. Dissolver todos os componentes, com exceção do $CaCl_2$, em 900ml de água destilada-deionizada. Adicionar o $CaCl_2$ até a completa dissolução.

2. Elevar o volume a 1.000ml com água destilada. O pH final deve ser igual a 6,5 ± 0,2.

3. Distribuir a solução em tubos com rosca (*screw-capped*) 16 x 123mm, à razão de 5ml por tubo.

4. Autoclavar (121°C/15min). Inclinar os tubos para solidificar em bisel (com base grossa).

5. Deixar esfriar e identificar os tubos como meio para *Acanthamoeba*.

6. Armazenar os tubos à temperatura de 4°C até três meses.

Inoculação e Axenização da Cultura

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Adicionar, assepticamente, 400UI/ml de penicilina G potássica e 400μg/ml de estreptomicina ao meio de *proteose peptone*.

3. Com alça de platina raspar gentilmente a superfície inclinada do meio não-nutritivo de ágar (24 a 36 horas de crescimento), procurando não romper o ágar. Ressuspender o sedimento em 50ml do meio de Page (solução salina para ameba) e centrifugar a 250 x *g*/5min, incubando os tubos a 37°C.

4. Subculturas para um novo tubo contendo meio de *proteose peptone* líquido devem ser realizadas em intervalos variáveis, no máximo de sete dias, para eliminar a associação com as bactérias dentro de duas a três semanas.

Meio Modificado de Nelson para *Naegleria fowleri*

Reagentes

1. *Panmede* (digerido de fígado de bovino)
2. Glicose ($C_6H_{12}O_6$)
3. Meio de Page (solução salina para ameba)
4. Penicilina G potássica
5. Sulfato de estreptomicina
6. Soro fetal de bovino

Meio de Nelson Modificado[1]

Panmede	1g
Glicose	1g
Meio de Page (solução salina para ameba)	1.000ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Preparação

1. Dissolver todos os componentes em 1.000ml do meio de Page (solução salina para ameba). Distribuir a solução em tubos com rosca (*screw-capped*) 16 x 125mm, à razão de 10ml por tubo.

2. Autoclavar (121°C/15min).

3. Deixar esfriar e identificar os tubos como meio de Nelson. Armazenar os tubos à temperatura de 4°C até três meses.

4. Antes do uso, suplementar cada tubo com o meio de Nelson com 0,2ml de soro fetal de bovino, estéril e inativado (56°C/30min).

5. Adicionar, assepticamente, 400UI/ml de penicilina G potássica e 400μg/ml de estreptomicina para cada tubo com o meio de Nelson modificado.

6. Inocular com as amebas.

Exflagelação dos Organismos

1. Examinar as placas diariamente para vestígios e movimentos de amebas. Quando presentes, as amebas alimentam-se das bactérias multiplicando-se e, em poucos dias, cobrem toda a superfície da placa. Uma vez que o alimento é consumido, as amebas se transformam em cistos.

2. Marcar, com lápis de cera, as áreas que apresentam grande número de trofozoítos de amebas.

3. Raspar a área marcada na superfície do ágar com uma alça triangular (Drigalsky), transferindo várias alçadas do raspado para um tubo com tampa de rosca estéril, contendo aproximadamente 2ml de água destilada estéril. Alternativamente, encher a superfície da placa de ágar com aproximadamente 10ml de água destilada; raspar gentilmente a superfície do ágar com alça de platina, transferindo o líquido para um tubo estéril e incubar a 37°C.

4. Com microscópio invertido, examinar periodicamente os tubos para a presença de flagelados.

a. A *N. fowleri* é o agente da meningoencefalite amebiana primária (MEAP), que sofre transformações para a forma piriforme flagelada, usualmente com dois flagelos e, ocasionalmente, com três ou quatro flagelos. O estágio de flagelado é uma forma temporária, na qual o protozoário não se alimenta, revertendo usualmente ao estágio de trofozoíto. Os trofozoítos da *N. fowleri* apresentam o corpo em forma aproximadamente cilíndrica, emitindo um só pseudópode grosso e hialino de cada vez, núcleo vesiculoso e com um nucléolo grande e central. Os trofozoítos da *N. fowleri* têm dimensões médias de 10 por 35μm e um ou mais vacúolos pulsáteis. Eles se encontram por toda a parte, principalmente em águas termais e efluentes aquecidos das indústrias. Quando colocados em água destilada, alguns deles se transformam, horas depois, em organismos biflagelados. A infecção humana é denominada naegleríase.

b. As espécies de *Acanthamoeba* infectam o homem ocasionalmente produzindo quadros clínicos muito diversos, como a meningoencefalite gra-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

nulomatosa ou lesões ulcerativas da córnea. Os trofozoítos não apresentam estágio flagelado, medem 15 por 45µm, produzem cistos uninucleados, com parede dupla provida de poros (ostíolos) e superfície irregular e apresentam vacúolos contráteis, os quais desaparecem e reaparecem em intervalos irregulares (45 a 50 segundos).

c. Os cistos da *Acanthamoeba* e *Naegleria* spp. são uninucleados[1].

Controle de Qualidade: Cultura de Amebas de Vida Livre

1. Verificar os reagentes e os meios de cultura (água destilada-deionizada, meio de Page, placas com ágar não-nutritivo e meio PYG), pelo menos uma vez por semana.

a. Os meios devem estar isentos de precipitação e de contaminação visível por bactérias e/ou fungos.

b. O meio de Page deve estar claro, sem contaminação visível por bactérias e/ou fungos.

c. Examinar as placas de ágar não-nutritivo ao microscópio invertido (com objetiva de 40X) para confirmar a não contaminação por bactérias ou fungos.

2. Manter as culturas padrões de *A. castellanii* (ATCC 30.010) e *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*.

a. Transferir mensalmente as culturas-padrão para o meio de ágar não-nutritivo (tubos em bisel, com base grossa) e para o meio de Page (solução salina para ameba).

b. Os trofozoítos da *Naegleria* e da *Acanthamoeba* são uninucleados, caracterizados por um grande e denso cariossoma central.

c. Para coloração, preparar esfregaços permanentes corados a partir das culturas-padrão. Os resultados somente serão aceitos quando o controle de qualidade dos organismos da cultura-padrão estiverem bem corados.

d. No mesmo momento em que os espécimes dos pacientes são inoculados, semear (a 37°C) em um novo meio fresco a cepa-padrão. Os resultados são aceitos quando o crescimento é visto até sete dias. Usar sempre o mesmo meio de cultura para o controle de qualidade e para a inoculação do espécime coletado do paciente.

e. Corar (métodos da hematoxilina férrica e/ou do tricrômico) uma lâmina preparada com a cultura-padrão em paralelo com a lâmina do material colhido do paciente. Os resultados são aceitos somente quando a lâmina-controle dos organismos estiver bem corada.

f. Inocular a *N. fowleri* em paralelo com a cultura do paciente para observar a exflagelação. Os resultados do teste são aceitos quando organismos flagelados piriformes, nadando livremente com dois flagelos, são observados em duas a 24 horas na lâmina-controle.

g. O microscópio deve ser calibrado a cada 12 meses. As objetivas e as oculares usadas na calibração devem ser mantidas em todas as medidas realizadas com o microscópio. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

h. Os resultados do CQ devem ser apropriadamente registrados[6].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Observações

1. Examinar, microscopicamente, todos os espécimes clínicos, especialmente SNC, imediatamente após sua chegada ao laboratório.

a. Colocar uma pequena gota do sedimento do LCR em lâmina de microscopia, cobrindo-a com lamínula de 22 x 22mm e selando as bordas com VASPAR, e examinar com objetivas de 10X e 40X (preferencialmente em contraste de fase ou microscopia de interferência diferencial). Quando é usada microscopia óptica, reduzir a iluminação para ajustar o diafragma.

b. Os trofozoítos da *N. fowleri* são muito móveis e podem ser identificados pelo seus movimentos sinuosos. O aquecimento da superfície da lâmina aumenta a atividade dos trofozoítos. Raramente organismos flagelados podem ser observados no campo microscópico.

c. Os trofozoítos da *Acanthamoeba* raramente são observados no LCR. Quando presentes, são reconhecidos pelos movimentos lentos através de pseudópodes típicos, denominados acantopódios (expansões semelhantes a espinhos). Ambas as amebas, especialmente a *Acanthamoeba*, podem ser identificadas pelos vacúolos contráteis.

d. A solução para lentes de contato deve ser examinada como o LCR.

e. Quando pequena quantidade de tecido é recebida no laboratório, reservar a amostra para o exame cultural.

2. Método alternativo para a preparação de placas de ágar não-nutritivo.

a. Distribuir o ágar não-nutritivo em tubos com rosca 20 x 150mm, à razão de 20ml por tubo.

b. Autoclavar os tubos (120°C/15min).

c. Estocar à temperatura de 4°C até 12 meses.

d. Antes do uso, liquefazer o ágar em banho de água.

e. Após distribuir em placas de Petri (100 x 15mm).

f. Deixar esfriar e armazenar à temperatura de 4°C até três meses.

3. Cepas ATCC de *E. coli* e *E. aerogenes* não são necessárias. São aceitos organismos clínicos isolados.

4. O crescimento da superfície das placas deve ser removido, fixado e corado pelo método do tricrômico e examinado com grande aumento (1.000X).

5. Os resultados devem ser confirmados através do exame direto a fresco e pela coloração do tricrômico e/ou da hematoxilina férrica para o estudo das características nucleares com o objetivo de diferenciar as amebas das células do hospedeiro.

6. Os organismos podem não ser isolados quando a velocidade e o tempo de centrifugação não forem observados.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

ANEXO

VASPAR

O VASPAR é uma mistura de vaselina e parafina (1:1).

Preparação

1. Misturar partes iguais de vaselina e parafina.
2. Aquecer em banho de água até a completa liquefação.
3. Remover a mistura do banho de água e distribuir a mistura em tubos com rosca (*screw-capped*) com capacidade de 20ml, à razão de 10 a 15ml por tubo.
4. Armazenar os tubos à temperatura ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ash LR, Oriehl TC. Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. Chicago (Ill): ASCP Press, 1991.
2. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3nd ed. Washington, DC: ASM Press, 1997.
3. Krogstad DA, Visvesvara GS, Walls KW et al. Blood and tissue protozoa. In: Ballows W, Hausler Jr WJ, Herrmann KL, Insenberg HD, Shadomy HJ, eds. Manual of Clinical Microbiology. 5th ed. Washington (DC): ASM Press, p.727-750, 1991.
4. Ma P, Visvesvara GS, Martinez AJ et al. *Naeglaria* and *Acanthamoeba* infections review. Rev Infect Dis 12:490-513, 1990.
5. Page FC. A New Key to Fresh Water and Soil Gymnamoebae. Fresh Water Biological Association. Ambleside, Cumbria LA22 0LP, United Kingdom: The Ferry House, 1988.
6. Visvesvara GS. Parasite Culture: *Acanthamoeba* and *Naegleria* spp. In: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press p. 7.9.2.1-7.9.2.8, v.2, 1992.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CAPÍTULO 22



Giardia lamblia

Geraldo Attilio De Carli

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Meyer cultivou, pela primeira vez em 1976[7], axenicamente, trofozoítos de *Giardia lamblia* no meio *Hanks-Serum-Phytone Peptone* (HSP-1). Os meios *Trypticase-Panmede Liver-Digest-Serum* TP-S-1[1] e *Trypticase-Yeast Extract-Iron-Serum* (TYI-S-33)[2], originalmente desenvolvidos para o cultivo axênico de *Entamoeba histolytica*, favorecem o crescimento axênico de *G. lamblia* ao serem esterilizados por filtração e não autoclavados[5,10]. Visvesvara[10] modificou e adaptou gradualmente a cepa original de Meyer (Portland-1) ao meio TP-S-1. Os diferentes lotes do *Panmede* (digerido de fígado de bovino), principal componente do meio TP-S-1, com freqüência apresentavam uma considerável variação na capacidade de auxiliar o crescimento da *E. histolytica*. Esse problema levou Diamond, Harlow e Cunnick[1] a desenvolverem um meio alternativo, o TYI-S-33 (*Tryptose-Yeast Extract-Iron-Serum*)[1], que apresenta em sua fórmula *trypticase* e *yeast extract* (*Biosate Peptone*, BBL). Apesar de a *G. lamblia* multiplicar-se lentamente nessa versão modificada do meio, as gerações são mais longas do que no meio TPS-1 com lotes satisfatórios de *Panmede*[4,6].

A *G. lamblia* é um organismo anaeróbio aerotolerante. Os meios de cultura contendo agentes tiorredutores em sua formulação, como a cisteína e a bile de mamíferos, favorecem o crescimento axênico dos trofozoítos desse organismo isolado do homem

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

e de outros animais. A cisteína e os outros agentes tiorredutores protegem os trofozoítos contra os efeitos letais do oxigênio molecular; esse efeito é suspenso pela adição do ácido ascórbico. Entretanto, somente o ácido ascórbico é capaz de suportar o crescimento dos trofozoítos. A cisteína é requerida no início da fixação dos trofozoítos à fase sólida (ex.: vidro ou plástico) *in vitro* e sua subseqüente adesão. O meio de Keister, modificação do TYI-S-33 suplementado com 10% (v/v) de soro de bovino ou de eqüíno, favorece o crescimento dos trofozoítos. Tubos de vidro ou de plástico podem ser usados para o cultivo. Durante o crescimento *in vitro*, os trofozoítos se aderem à parede do tubo de cultura formando um "tapete homogêneo", o qual torna-se confluente no fim da fase logarítmica do crescimento. Os trofozoítos móveis não aderidos ao tubo podem ser observados livres no meio de cultura[3,9].

Apesar da discordância relacionada com os nomes específicos *intestinalis* e *lamblia*, ambos os nomes continuam a ser usados para descrever o organismo; entretanto, Meyer[8] prefere usar *Giardia duodenalis*.

Meio *Trypticase-Yeast Extract-Iron-Serum* (TYI-S-33) Modificado (*Biosate-Iron-Serum*) (BI-S-33)

O meio *Trypticase-Yeast Extract-Iron-Serum* (TYI-S-33) modificado (*Biosate-Iron-Serun*) (BI-S-33)[1,10] é indicado para o isolamento e cultivo de trofozoítos de *Giardia lamblia*.

Amostra

1. Fezes, muco ou a combinação de ambos. As amostras fecais devem ser frescas.

2. O tempo de colheita do material fecal influi de maneira direta no isolamento das giardias. As amostras devem ser inoculadas dentro de 24 horas após a passagem.

Reagentes

1. *Biosate* (BBL)
2. Glicose ($C_6H_{12}O_6$)
3. Cloreto de sódio (NaCl)
4. Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)
5. Hidrogenofosfato dipotássico anidro (K_2HPO_4)
6. L-cisteína, cloridrato ($C_3H_7NO_2S.HCl$)
7. Ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$)
8. Citrato férrico amoniacal (pó marrom)
9. Bile bovina (Sigma, n.º B-3883)
10. Soro de bovino adulto
11. Penicilina G potássica
12. Sulfato de estreptomicina

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Meio de Cultura

Biosate (BBL)	3g
Glicose	1g
Cloreto de sódio	200mg
Diidrogenofosfato de potássio	60mg
Hidrogenofosfato dipotássico anidro	100mg
L-cisteína, cloridrato	200mg
Ácido ascórbico	20mg
Citrato férrico amoniacal	2,28mg
Bile bovina desidratada	25mg
Água destilada-deionizada	87ml

pH 7,0-7,2

Soro de bovino adulto estéril e inativado (3 min-56°C)	15ml
Penicilina G potássica	100.000UI
Sulfato de estreptomicina	100mg

Preparação

1. Dissolver NaCl, K_2HPO_4 e KH_2PO_4 em 60ml de água. Adicionar e dissolver os ingredientes remanescentes na ordem apresentada, *biosate*, glicose, cloridrato de L-cisteína, ácido ascórbico, citrato férrico amoniacal e bile bovina.

2. Completar o volume. Ajustar o pH, sem o soro de bovino e antibióticos, em 7,0-7,2, com NaOH 1M.

3. Esterilizar o meio através de membrana filtrante (*Millipore*) de 0,22μm. Distribuir o meio, assepticamente, em tubos com tampa de rosca (*screw-capped*) 10 x 10mm, Pyrex n.º 9825, na razão de 6ml por tubo. Armazenar à temperatura de 4-5°C até 30 dias.

ou

4. Para cada 100ml do meio completo adicionar 10ml de soro bovino ou de cavalo estéril e inativado (56°C/30min) e 90ml do meio completo estéril. Armazenar à temperatura de 4°C até duas semanas.

5. As subculturas dos parasitos são realizadas a cada 72 horas.

6. Inocular 2-3ml da cultura no meio novo. Quando houver poucos trofozoítos no meio, os organismos aderidos à parede do tubo são destacados pelo resfriamento rápido (~10 min) em banho de gelo ou usar a cultura inicial.

Observações

1. A mistura de vitaminas descrita por Diamond, Harlow e Cunnick[1] foi omitida no meio TYI-S-33 ou BI-S-33. O meio *Biosate Peptone*, código

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

n.° 11862 BBL (rótulo branco), possui em sua fórmula *Pancreatic Digest of Casein* (65%) e *Yeast Extract* (35%).

2. O meio de cultura nunca deve ser autoclavado, mas sempre filtrado em membrana (*Millipore*). Usar estante inclinada durante a incubação.

Meio de Keister (Modificação do Meio *Trypticase-Yeast Extract-Iron-Serum* (TYI-S-33)

O meio de Keister é indicado para o cultivo e o isolamento de trofozoítos de *Giardia lamblia*[1,9].

Amostra

Aspirado de jejuno.

Reagentes

1. Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)
2. Hidrogenofosfato dipotássico anidro (K_2HPO_4)
3. Peptona (digerido de caseína) (BBL)
4. Extrato de levedo (Difco)
5. Glicose ($C_6H_{12}O_6$)
6. Cloreto de sódio (NaCl)
7. L-cisteína, cloridrato ($C_3H_7NO_2S.HCl$)
8. Ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$)
9. Citrato férrico amoniacal (pó marrom)
10. Bile bovina desidratada (Sigma B-8381)

Meio de Cultura

Meio Básico

Diidrogenofosfato de potássio	2g
Hidrogenofosfato dipotássico anidro	1,2g
Peptona (digerido de caseína)	40g
Extrato de levedo	20g
Glicose	20g
Cloreto de sódio	4g
L-cisteína, cloridrato	4g
Ácido ascórbico	400mg
Citrato férrico amoniacal	45,6mg
Bile bovina desidratada	2g
Água destilada-deionizada	1.800ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Preparação

1. Dissolver os ingredientes em um litro de água destilada-deionizada.

2. Ajustar o pH em 7,0 com NaOH 1M. Completar o volume em 1.800ml com água destilada.

3. Clarificar o meio pela passagem através de papel-filtro Whatman n.º 1 e esterilizar pela filtração em membrana filtrante (0,45μm).

4. Distribuir nos volumes requeridos (90ml do meio em frasco estéril com capacidade de 100ml). Armazenar o meio básico a -20°C.

Meio Completo

1. Adicionar, assepticamente (em capela de segurança biológica de fluxo laminar vertical) para cada fresco com 90ml do meio básico, 10ml de soro bovino estéril e inativado (56°C/30min).

2. Armazenar o meio completo estéril a 4°C até duas semanas.

Amostra

Aspirado do jejuno.

Isolamento

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Aquecer 20ml do meio completo suplementado com antibióticos (penicilina G potássica 100UI/ml, sulfato de estreptomicina 100μg/ml, vancomicina 20μg/ml e clindamicina 20μg/ml) à temperatura de 35ºC.

3. Centrifugar o aspirado do jejuno (500 x *g*/2min) em frasco estéril, ressuspendendo o sedimento com pequena quantidade do meio completo (suplementado com antibióticos).

4. Transferir a suspensão para tubo estéril com tampa de rosca (*screw-capped*). Adicionar suficiente meio para completar 90-95% da capacidade total do tubo.

5. Incubar as culturas à temperatura de 35°C na posição horizontal ou vertical (ângulo de 5°) e examinar diariamente até uma semana.

6. Examinar com microscópio invertido (aumentos de 10X e 20X, respectivamente) a superfície interna do tubo para a pesquisa de trofozoítos aderidos à parede e o meio para a observação de trofozoítos livres. Quando os trofozoítos forem vistos, girar o tubo de cultura com um movimento de 180°. Essa rotação permite a expansão dos trofozoítos isolados na superfície do tubo, enquanto os contaminantes próximos aos organismos flagelados serão sedimentados no lado oposto.

7. Repetir a etapa 4.

8. Trocar o meio de cultura a cada três a quatro dias pela decantação do meio velho e substituição por meio fresco e completo. Esse procedimen-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

to remove gradualmente os contaminantes da cultura. Todas as trocas devem ser realizadas em condições de assepsia total.

9. Quando as culturas estiverem livres de contaminantes, não usar antibióticos na formulação do meio, manter a cultura axênica.

10. Depois de 24 horas, examinar as culturas com microscópio invertido (objetivas de 20X e 40X), para determinar se os trofozoítos estão se multiplicando[9].

Controle de Qualidade (CQ): Meio TYI-S-33

1. Controlar semanalmente e sempre que for usado o meio TYI-S-33.

2. O meio não deve apresentar sinais de precipitação e nenhuma contaminação visível por bactérias e/ou fungos.

3. Manter a cultura-padrão de *G. lamblia* a 35°C (ATCC 30.888, cepa Portland-1 ATCC). Transferir semanalmente a cultura-padrão (ATCC 30.888) para o meio TYI-S-33.

4. O micrômetro ocular e o microscópico devem ser calibrados a cada 12 meses. Colocar as objetivas e as oculares originais no microscópico durante a calibração.

5. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados. Quando necessário, seguir plano de ação para resultados "fora de controle".

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans R Soc Trop Med Hyg 72:431-432, 1978.
2. Diamond LS. Lumen dwelling protozoa: *Entamoeba*, trichomonads, and *Giardia*. In: Jensen JP, ed. In vitro Cultivation of Protozoan parasites. Boca Raton, Fla: CRC Press, p. 65-109, 1983.
3. Diamond LS. *Entamoeba*, *Giardia* and *Trichomonas*. In: Taylor ERA, Baker JR, eds. In vitro Methods for Parasite Cultivation. New York: Academic Press, p. 1-28, 1987.
4. Farthing SR, Varsno SR, Keusch GT. Mammalian bile promotes growth of *Giardia lamblia* in axenic culture. Trans R Soc Trop Med Hyg 77:467-469, 1983.
5. Gillin FD, Diamond LS. Entamoeba histolytica and *Giardia lamblia*: Growth responses to reducing agents. Exp Parasitol 51:382-391, 1981.
6. Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans R Soc Trop Med Hyg 77:487-488, 1983.
7. Meyer EA. *Giardia lamblia*: Isolation and axenic cultivation. Exp Parasitol 39:101-105, 1976.
8. Meyer EA. Pathology and pathogenesis of the intestinal mucosal damage in giardiasis. In: Ferguson A, Gillon J, Munro G, eds. Human Parasitic Diseases. New York: Elsevie, p.155-173, 1990.
9. Smith HV. Intestinal protozoa. In: Gillespie SM, Hawkey PM, eds. Medical Parasitology. A Pratical Approach. Oxford: Oxford University Press 79-118, 1995.
10. Visvesvara GS. Axenic growth of *Giardia lamblia* in Diamond's TP-S-33 medium. Trans R Soc Trop Med Hyg 74:213-215, 1980.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Capítulo 23



Trypanosoma cruzi, *Trypanosoma rangeli* e *Leishmania* spp.

Mário Steindel
Edmundo Carlos Grizard

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Diferentes parasitos sangüíneos e teciduais podem ser cultivados em meios de cultura distintos. Entre esses parasitos, os tripanossomatídios patogênicos podem ser isolados e cultivados em uma variedade de meios líquidos ou mistos (bifásicos) que contenham hemina ou seus derivados. Em face dos requisitos nutricionais e fisiológicos distintos de células, determinados meios de cultura são mais apropriados para o isolamento e/ou cultivo de uma ou outra espécie de parasito.

Até a década de 1970 uma das grandes dificuldades de realizar trabalhos com o *T. cruzi* era a falta de um meio de cultura apropriado de fácil preparação, que pudesse ser utilizado por diferentes pesquisadores e laboratórios, permitindo a comparação dos resultados obtidos. Nesse caso, o problema foi objeto da primeira Reunião sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas, realizada em 1974 em Caxambu (MG), onde o meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT), idealizado por Yeager[9] e modificado por Camargo[2], foi escolhido como meio de cultura padrão para o cultivo do parasito.

Meios líquidos são particularmente úteis para o isolamento e posterior caracterização de parasitos através de estudos biológicos (crescimento, diferenciação e morfogênese), imunológicos, bioquímicos e moleculares para fins diagnósticos e de identificação específica. O cultivo destes parasitos de forma axênica

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

em meios líquidos permite ainda a utilização de contadores eletrônicos de partículas do tipo *cell counter* no monitoramento do crescimento celular[2]. Este fato é de grande relevância, pois permite o estudo simultâneo de um grande número de amostras e clones de forma rápida e precisa, como, por exemplo, em estudos de atividade antiparasitária de compostos. Entretanto, a manutenção prolongada de cepas em cultivo contínuo pode levar à seleção de subpopulações mais adaptadas a estas condições, ocasionando uma perda de heterogeneidade genética da amostra, podendo levar à perda parcial ou total da virulência do parasito para o hospedeiro vertebrado. Quando não levada em conta pelo pesquisador, esta seleção artificial de amostras pode levar a conclusões e inferências biológicas, bioquímicas, imunológicas e epidemiológicas errôneas. Além disso, deve-se considerar que a forma do parasito quando em cultivo *in vitro* normalmente não corresponde à forma do parasito quando no hospedeiro vertebrado.

CEPAS-PADRÃO

De maneira geral, cada cepa de *T. cruzi*, *T. rangeli* ou *Leishmania* spp. compreende uma população heterogênea de parasitos, composta por distintos clones, que circulam nos ciclos silvestre e doméstico de transmissão entre homem, insetos vetores e animais reservatórios.

Para efeitos de estudo, existem várias cepas desses parasitos que foram amplamente caracterizadas por inúmeros métodos e laboratórios, as quais podem ser utilizadas como amostras-padrão para os estudos de identificação e caracterização específica[1]. Entretanto, deve-se atentar para a representatividade destas amostras, conforme o anteriormente citado. Entre as várias amostras-padrão disponíveis de cada espécie, tratadas nesse capitulo, podemos citar as cepas Y; Colombiana; CL e o clone CL-Brener de *T. cruzi*; as cepas San Agustin; Choachi e SC-58 de *T. rangeli* e as cepas MHOM/BR/75/M2903 de *L. brasiliensis;* IFLA/BR/67/PH8 de *L. amazonensis* e MHOM/BR/74/PP75 de *L. chagasi,* amplamente utilizadas na literatura[6]. Amostras destes parasitos são mantidas em criobancos como o da Fiocruz (RJ-Brasil), Universidade de São Paulo — USP (SP-Brasil), ATCC (EUA) e em vários laboratórios de pesquisa no Brasil e no exterior, sendo normalmente disponíveis para aquisição ou doação.

REAGENTES

Como para qualquer experimento ou procedimento, os reagentes e sais utilizados na preparação de meios de cultura precisam obrigatoriamente ser de boa qualidade. Um dos ingredientes fundamentais para a preparação de meios de cultura para tripanossomatídios é o soro bovino fetal (SBF). A utilização de SBF de procedência certificada é a mais indicada. Entretanto, devido ao seu elevado custo, muitas vezes este é substituído por soro total de bovinos adultos obtido em matadouros. Em se utilizando o soro bovino total, o sexo, idade, patógenos associados, hormônios e medicamentos administrados a estes animais podem interferir de forma desastrosa no cultivo dos parasitos. Desta forma, recomenda-se sempre utilizar soro de in-

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

divíduos machos e jovens, testando cada partida de soro quanto ao crescimento celular e à presença de micoplasma, uma vez que este patógeno não é retido no processo de filtração utilizado na preparação do meio de cultura.

MEIOS DE CULTURA

Entre os vários meios de cultura atualmente disponíveis, o mais utilizado para o cultivo de *T. cruzi* e *T. rangeli* é o meio LIT[2], acrescido de diferentes concentrações de SBF, ou ainda associado a outros meios de cultivo. Esse meio de cultura proporciona um bom crescimento para a grande maioria das amostras de *T. cruzi*, além de proporcionar também a diferenciação *in vitro* de formas epimastigotas (multiplicativas) em tripomastigotas (infectivas). Outro meio de cultura muito utilizado, principalmente no isolamento de tripanossomatídios patogênicos, é o meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN). Este meio é extremamente rico em nutrientes, sendo particularmente útil para o isolamento, a manutenção e o crescimento de *T. rangeli* e de certas amostras de T. *cruzi* e de *Leishmania* spp. de difícil crescimento *in vitro*[6,8]. Um meio muito utilizado na manutenção de *Leishmania* spp. *in vitro* é o meio *Brain Heart Infusion* (BHI). Inicialmente os componentes desse meio eram preparados em cada laboratório, porém diversas marcas do produto desidratado e pronto para preparo estão disponíveis no mercado na atualidade, bastando adicionar antibióticos e hemina. Outros meios como MEM (*Minimum Essential Medium*), DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), Grace, Schneider e TC-100, foram desenvolvidos para cultivos celulares distintos, podendo também ser utilizados para o cultivo destes flagelados, porém apresentando resultados inferiores aos obtidos com os meios já citados. Estes meios são disponibilizados por diferentes empresas, necessitando, entretanto, de suplementação com hemina e/ou SBF como condição fundamental para assegurar o crescimento do parasito. Meios quimicamente definidos têm sido utilizados com sucesso no estudo de metabolismo e fisiologia celular de tripanossomatídios inferiores como *Crithidia fasciculata.* Entretanto, para o cultivo de *T. cruzi* e *T. rangeli* estes mesmos meios não se mostraram apropriados.

A necessidade de produção *in vitro* de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, em geral, é feita a partir de culturas envolvendo células hospedeiras, sendo este método dispendioso e exigindo laboratórios adaptados e pessoal devidamente treinado. A obtenção dessas formas do *T. cruzi* é necessária sob vários aspectos, entre os quais podemos citar os estudos de fenômenos envolvidos na diferenciação do parasito, no isolamento e na caracterização de antígenos de interesse diagnóstico, no estudo de constituição protéica e nos experimentos de controle e cura da doença de Chagas através de técnicas como a lise mediada pelo complemento[5] ou a citometria de fluxo[7]. Nesse sentido, diferentes meios de cultura têm sido desenvolvidos na tentativa de induzir a diferenciação do parasito *in vitro*. Entre estes, o meio *Triatomine Artificial Urine* (TAU) e suas variantes, TAUP e TAU3AAG, induzem a elevadas taxas de diferenciação do parasito *in vitro*[3,4].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

MEIO *LIVER INFUSION TRYPTOSE* (LIT)

Uma das dificuldades iniciais na preparação do meio de cultura, *Liver Infusion Tryptose* (LIT), em diferentes laboratórios, consistia na necessidade da existência de um aparato de filtração para a esterilização do meio. Recentemente, um novo protocolo de preparação do meio LIT foi desenvolvido no laboratório do Dr. Gregory Buck, da University of Virginia (EUA), no qual os distintos componentes podem ser esterilizados por autoclavação. Vários laboratórios brasileiros já vêm usando rotineiramente este protocolo de preparação do meio e os resultados de crescimento do parasito são iguais ou superiores aos obtidos para o meio esterilizado por filtração, reduzindo o custo, o tempo de preparação e a possibilidade de contaminação.

Reagentes

1. *Liver Infusion Broth*, pó (Difco 0269-17-7)
2. *Tryptose* (Difco)
3. Hemina (Sigma H2250) ($C_{34}H_{32}ClFeN_4O_4$)
4. Trietanolamina (Sigma T1377) ($C_6H_{15}NO_3$)
5. Hidrogenofosfato dissódico anidro (Na_2HPO_4)
6. Cloreto de potássio (KCl)
7. Cloreto de sódio (NaCl)
8. Glicose ($C_6H_{12}O_6$)
9. Ácido fosfórico (H_2PO_4)
10. Soro bovino fetal estéril inativado (SBF)
11. Penicilina G potássica
12. Sulfato de estreptomicina

Preparação

Solução 1

Solução de Infuso de Fígado (*Liver Infusion Broth)* a 10%

Preparar solução a 10% de *liver infusion broth*, dissolvendo o meio em água destilada-deionizada. Distribuir a solução de infuso de fígado em frascos com rosca *(screw-capped)*, à razão de 50ml por frasco. Autoclavar (121°C/20min). Deixar esfriar à temperatura ambiente; após, estocar à temperatura de -20°C ao abrigo da luz.

Solução de Hemina

Hemina	250mg

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Trietanolamina	5ml
Água destilada-deionizada	5ml

• Misturar a trietanolamina com a água destilada-deionizada em frasco com capacidade de 50ml, adicionar à mistura a hemina, agitar em *vortex* até a completa dissolução (a dissolução pode levar de 20 a 30 minutos). A solução de hemina deve ser preparada no momento do uso e não deve ser armazenada.

Solução 2

Solução de Sais (4X)

Hidrogenofosfato dissódico anidro	80g
Cloreto de potássio	4g
Cloreto de sódio	40g
Tryptose	50g
Água destilada-deionizada	2.000ml

• Acrescentar e dissolver os ingredientes, sais e a *tryptose*, na ordem apresentada em 1.000 a 1.500ml de água destilada-deionizada aquecida (30-35°C). Agitar moderadamente até a completa dissolução dos ingredientes. Com agitação contínua adicionar a solução de hemina. Ajustar o pH da solução em 7,4 com ácido fosfórico concentrado. Não é recomendado usar ácido clorídrico (HCl). Homogeneizar e completar o volume da solução em 2.500ml. Distribuir a solução em frascos com rosca *(serew-capped)*, à razão de 250ml por frasco. Autoclavar (121°C/20min). Deixar esfriar à temperatura ambiente. Estocar à temperatura ambiente ou a 4°C ao abrigo da luz.

Solução 3

Solução de Glicose a 40% (m/v)

Dissolver a glicose em água destilada-deionizada. Distribuir a solução em frascos com rosca *(screw-capped)*, à razão de 10ml por frasco. Autoclavar (121°C/20min). Deixar esfriar à temperatura ambiente. Estocar à temperatura de 4°C para uso imediato ou a -20°C até seis meses.

Solução de Antibióticos

Diferentes antibióticos podem ser utilizados na preparação do meio completo de LIT. Os mais utilizados são a penicilina G potássica (100UI/ml) e o sulfato de estreptomicina (100µg/ml). Outros antibióticos, como

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

canamicina (100μg/ml), gentamicina (100μg/ml) e ampicilina (10mg/ml), também podem ser usados. Jamais deve-se adicionar às culturas antifúngicos, como a anfotericina B (Fungizon) ou a nistatina ou a associação destes com antibióticos. Esses antifúngicos têm elevada atividade tripanossomicida para as formas de cultura de *T. cruzi* e *Leishmania* spp.

Soro Bovino Fetal (SBP)

O soro bovino fetal pode ser substituído por soro bovino total estéril; entretanto, apresenta menor rendimento quando comparado com o SBF. O soro deve ser inativado (56°C/30min). Armazenar o soro à temperatura de -20°C. A congelação, a descongelação e a inativação do soro total e do SBF podem levar ao aparecimento de um precipitado, composto principalmente de crioglobulinas, o que não deve ser confundido com uma possível contaminação. A retirada das crioglobulinas pode ser realizada pela centrifugação ou filtração. Para o cultivo do *T. rangeli* é recomendado adicionar 20% de SBF.

Meio Completo

Solução 1	50ml
Solução 2	250ml
Solução 3	10ml
Água destilada-deionizada	590ml
Soro bovino fetal estéril inativado (SBF)	100ml

• Misturar as soluções em frasco estéril, com capacidade de 1.000ml, na ordem apresentada. Imediatamente antes do uso, adicionar o SBF não-diluído, estéril e inativado (56°C/30min); penicilina G potássica (100UI/ml) e sulfato de estreptomicina (100μg/ml). Pela facilidade de preparação do meio, é recomendada a preparação mensal ou bimensal. Evitar o armazenamento por períodos prolongados. Todas as preparações são realizadas em condi-

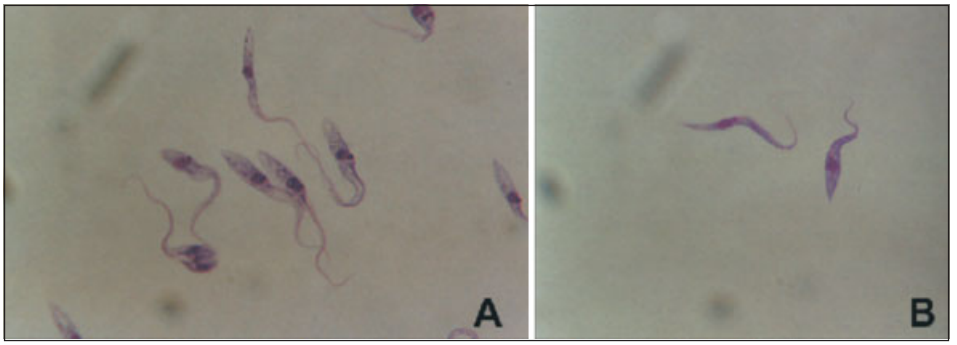


Fig. 23.1 — *(A) Forma epimastigota de cultura de* Trypanosoma cruzi*; (B) Forma epimastigota de cultura de* Trypanosoma rangeli*. Cultivo no meio LIT. Organismos corados pelo método de Giemsa. Aumento 1.000X.*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

ções de assepsia total (em capela de segurança biológica de fluxo laminar vertical) (Fig. 23.1).

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN)

O meio de MacNeal, Novy e Nicolle (NNN), conhecido como ágar-sangue, é uma das melhores escolhas para o isolamento e manutenção de tripanossomatídeos patogênicos. O meio é bifásico, composto de uma base de ágar-sangue e complementado com o meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT).

Reagentes

1. Bacto-Ágar (Difco 1545-01)
2. Cloreto de sódio (NaCl)
3. Sangue desfibrinado de coelho

Preparação

Bacto-Ágar	1,4g
Cloreto de sódio	0,6g
Água destilada-deionizada	85ml
Sangue desfibrinado de coelho	15ml

1. Sangue Desfibrinado de Coelho

a. Cobrir o fundo de um *erlemeyer* (capacidade de 125ml) com pérolas de vidro com 2 a 3mm de diâmetro. Autoclavar (121°C/20min) e secar em estufa (37°C).

b. Colher assepticamente, por punção cardíaca, sangue de coelho. Transferir o sangue, imediatamente após, para *erlemeyer* estéril com as pérolas de vidro. Desfibrinar por 10 minutos o sangue pela agitação contínua através de movimentos circulares.

2. Meio Básico

a. Dissolver o ágar e o NaCl em 85ml de água. Aquecer a solução em banho de água, até a liquefação total do ágar.

b. Autoclavar (121°C/20min). Resfriar a mistura a 50-55°C em banho de água ou manter o meio na autoclave fechada.

c. Suplementar o ágar com 15ml de sangue desfibrinado de coelho. Homogeneizar a mistura pela agitação. Evitar a formação de espuma.

d. Distribuir o meio em tubos com rosca *(screw-capped)* 16 x 125mm, à razão de 5ml por tubo. Inclinar os tubos, durante uma hora à temperatura

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

ambiente, para solidificar em bisel (com base grossa). Deixar esfriar e identificar os tubos com o meio.

e. Armazenar os tubos à temperatura de 4°C (ao abrigo da luz) até 20 a 30 dias.

3. Meio Completo

No momento do uso, deixar os tubos com ágar (meio básico) à temperatura ambiente para estabilizar a temperatura do meio. Adicionar aos tubos com o meio NNN 5ml do meio LIT, ou suficiente quantidade de meio para cobrir o bisel de ágar-sangue. Este meio é extremamente rico, permitindo um excelente crescimento de tripanossomatídeos.

Observações

1. Não é necessário adicionar antibióticos ao meio NNN, uma vez que o meio LIT é suplementado com penicilina G potássica (100UI/ml) e sulfato de estreptomicina (100mg/ml).

2. Todas as transferências devem ser realizadas em condições de assepsia total.

Meio *Brain Heart Infusion* (BHI)

O meio *Brain Heart Infusion* (BHI) tem sido intensamente utilizado, com sucesso, no cultivo de diferentes espécies de *Leishmania* spp. O meio é simples e barato, de fácil preparação e não requer equipamentos sofisticados. O meio BHI, assim como os meios anteriormente descritos, deve ser suplementado com soro bovino fetal estéril inativado (SBF) e hemina a fim de sustentar o crescimento das diferentes espécies do gênero *Leishmania*[6]. O meio pode ainda ser utilizado em conjunto com o meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT) ou com uma base de ágar como a utilizada no meio MacNeal, Novy e Nicolle (NNN).

Reagentes

1. *Brain Heart Infusion* (BHI), pó (Difco 0037-17-8)
2. Solução de hemina (2mg/ml) ($C_{34}H_{32}ClFeN_4O_4$)
   (ver preparação no meio LIT)

Preparação

Brain Heart Infusion	37g
Solução de hemina	5ml
Água destilada-deionizada	1.000ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

• Adicionar o BHI em pó à água destilada-deionizada previamente aquecida à temperatura de 30-35°C. Agitar até a completa dissolução. O pó será completamente dissolvido após o aumento da temperatura quando da autoclavagem. Ajustar o pH em 7,4. Autoclavar (121°C/20min). Deixar esfriar. Após, acrescentar penicilina G potássica (100UI/ml) e sulfato de estreptomicina (100µg/ml) e a solução de hemina (2mg/ml). Armazenar o meio à temperatura de 4°C (ao abrigo da luz).

Observações

1. Preparar a solução de hemina (2mg/ml) como foi descrito na preparação do meio LIT. Esterilizar a solução por filtração em membrana *Millipore* de 0,22µm de porosidade, no momento do uso nas quantidades requeridas.

2. Utilizar os mesmos antibióticos e quantidades como foi descrito para o meio LIT.

3. Pela facilidade de preparação, recomenda-se preparar o meio BHI somente na hora do uso e nas quantidades necessárias.

Meio de Schneider (*Schneider's Insect Medium*)

Esse meio foi desenvolvido para o cultivo de células de insetos, sendo indicado, também, para o cultivo de *Leishmania* spp. O meio é vendido comercialmente (Sigma S-9895) e pode ser adquirido em pó ou já preparado (líquido) com antibióticos e estéril. Segundo especificações do fabricante, o meio em pó deve ser preparado como segue:

1. Adicionar o conteúdo do frasco (pó) em 800ml de água destilada-deionizada previamente aquecida (20-25ºC). Agitar moderadamente até a completa dissolução. Quando necessário, retirar o pó remanescente com pequena quantidade de água.

2. Adicionar, sob agitação, 0,4g de hidrogenocarbonato de sódio ($NaHCO_3$).

3. Ajustar, inicialmente, o pH em 9,0 com solução NaOH 1M e agitar por 10 minutos. A solução poderá ficar turva. Após, ajustar o pH em 6,9 com solução de HCl 1M, quando a solução ficará límpida.

4. Preparar, separadamente, a solução de cloreto de cálcio ($CaCl_2$), dissolvendo 0,6g do sal em 50ml de água destilada-deionizada. Adicionar essa solução ao meio sob forte agitação para evitar precipitação.

5. Mantendo a solução sob agitação, ajustar novamente o pH (0,1 a 0,3 unidades de pH) abaixo do desejado usando soluções 1M de NaOH ou HCl uma vez que, após a filtração para esterilização, o pH poderá subir 0,1 a 0,2 unidades.

6. Completar o volume do meio em 1.000ml com água destilada-deionizada e esterilizar por filtração em membrana *Millipore* de 0,22µm de porosidade.

7. Armazenar o meio completo à temperatura de 4-5°C ao abrigo da luz.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Meio *Triatomine Artificial Urine* (TAU)

O meio *Triatomine Artificial Urine* (TAU) simula a urina de triatomíneos, sendo indicado para a diferenciação das formas epimastigotas do *T. cruzi* das formas tripomastigotas metacíclicas. Este meio não se apresentou viável na manutenção de *Leishmania* spp. e *T. rangeli.*

Reagentes

1. Cloreto de sódio (NaCl)
2. Cloreto de potássio (KCl)
3. Cloreto de cálcio ($CaCl_2$)
4. Cloreto de magnésio ($MgCl_2$)
5. Tampão de fosfatos pH 6,8 (ver p. 298)
6. Prolina ($C_5H_9NO_2$)
7. L-glutamato de sódio ($C_5H_8NNaO_4$)
8. Glicose ($C_6H_{12}O_6$)
9. L-aspartato ($C_4H_7NO_4$)

Meio *Triatomine Artificial Urine* (TAU)

Cloreto de sódio	190mM
Cloreto de potássio	17mM
Cloreto de cálcio	2mM
Cloreto de magnésio	2mM
Tampão fosfato pH 6,8	8mM

Observações: Duas variantes do meio TAU são descritas. Através da adição de (10mM) de prolina o meio passa a chamar-se **TAUP** e após a suplementação com L-glutamato (50mM), L-aspartato (2mM) e Glicose (10mM) o meio passa a chamar-se **TAU3AAG.**

Controle de Qualidade (CQ)

Independentemente do meio a ser utilizado, o primeiro passo após a preparação é a verificação da esterilidade. Para tanto, uma a duas amostras do meio de cultura preparado devem ser colocadas em tubos estéreis e cultivadas por 48 a 72 horas a 37°C. Esse procedimento simples deve ser adotado antes que o meio seja colocado em uso. Outro controle de importância crucial é o teste de crescimento. Após o teste de esterilidade, o teste de crescimento é realizado através da comparação das curvas de crescimento de determinado parasito nas diferentes preparações do meio. Para tanto, inóculos padronizados são realizados em tubos ou frascos contendo quantidades iguais do meio em uso e do novo meio preparado. Contagens diárias

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

do número de parasitos por mililitro de meio são realizadas durante uma semana, comparando-se o rendimento das duas preparações. Por exemplo, o meio LIT recebendo um inóculo de 10 x 10^6 flagelados/ml deve suportar um crescimento de 80 a 100 x 10^6 parasitos/ml ao final de uma semana. Além disso, é também recomendada a observação da morfologia dos parasitos, tanto a fresco como em esfregaços corados pelo método de Giemsa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brener Z. O parasito: relações hospedeiro-parasito. In: Brener Z, Andrade Z, eds. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1-41, 1979.
2. Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypannosomoses in liquid media. Rev Inst Med Trop (São Paulo) 6:93-100, 1964.
3. Contreras VT, Salles JM Thomaz N et al. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. Mol Biochem Parasitol 16:315-317, 1985.
4. Contreras VT, Araujo Jorge TC, Bonaldo MC et al. Biological aspects of the DM28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. Mem Inst Oswaldo Cruz 83:123-133, 1988.
5. Galvão LM, Nunes RM, Cançado JR, Brener Z, Krettli AU. Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas diesase: a 10 years follow-up study. Trans R Soc Trop Med Hyg 87:220-223, 1993.
6. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil: V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso State, and observation on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. Trans R Soc Trop Med Hyg 64:654-667, 1970.
7. Martins-Filho OA, Pereira ME, Carvalho JF et al. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas'disease. Clin Diagn Lab Immunol 2:569-573, 1995.
8. Peter W, Killick-Kendrick R, eds. The Leishmaniases in biology and medicine. Vol I. London: Academic Press, p. 499-541, 1987.
9. Yaeger RG. A method of isolating trypanosomes from blood. J Parasitol 46:288, 1960.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Capítulo 24



Plasmodium falciparum

Cor de Jesus Fernandes Fontes

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As quatro espécies reconhecidas de *Plasmodium* que causam a malária no homem são: o *Plasmodium vivax*, o *Plasmodium malariae*, o *Plasmodium falciparum* e o *Plasmodium ovale*. Dessas quatro espécies de plasmódio causadoras de malária humana, apenas o *P. falciparum* é passível de ser mantido e reproduzido em cultura *in vitro*. Tentativas para cultivar o plasmódio foram feitas desde a sua descoberta no início do século XX. Entretanto, foram Trager e Jensen[6] que conseguiram, com sucesso, descrever uma técnica eficiente de cultura contínua do *P. falciparum*. A partir daí tornou-se possível realizar a triagem de fármacos para compor o arsenal terapêutico da malária humana, assim como produzir antígenos do ciclo sangüíneo para utilização no diagnóstico sorológico da doença.

Para atender aos mais diferentes objetivos, a técnica original[6] sofreu modificações no decorrer dos anos. Entretanto, o procedimento é relativamente simples, consistindo em manter eritrócitos humanos infectados com o protozoário em meio de cultura sintético, enriquecido com soro humano (ou de coelho) e mantidos à temperatura de 37°C e em atmosfera de 3% a 4% de dióxido de carbono (CO_2) e 16% de oxigênio (O_2). Esta condição atmosférica é facilmente conseguida com o auxílio de um dessecador de vidro, no qual é deixada queimar, completamente, a chama de uma vela.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Todos os procedimentos relativos à cultura do parasito devem ser realizados, em condições de assepsia total, em capela de segurança biológica de fluxo laminar vertical, com material esterilizado (em autoclave) ou pré-esterilizado descartável, a fim de manter as condições de assepsia essenciais para evitar a contaminação por fungos e bactérias. Uma vez que é possível a infecção acidental por plasmódio e que, mesmo em cultivo, os parasitos permanecem infectantes[7], todas as normas de biossegurança devem ser seguidas e observadas.

Meio de Cultura de Trager e Jensen (RPMI 1640)

Reagentes

1. RPMI 1640 (Gibco)
2. Tampão HEPES (Calbiochem) 25mM
3. Gentamicina
4. Hipoxantina ($C_5H_4N_4O$)
5. L-glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$)
6. Plasma humano dos grupos A ou AB
7. Solução de hidrogenocarbonato de sódio 5% ($NaHCO_3$)
8. Dimetilsulfóxido (DMSO) (C_2H_6SO)
9. Glicerol (Glicerina) ($C_3H_8O_3$)
10. Glicose ($C_6H_{12}O_6$)
11. Cloreto de sódio (NaCl)
12. Heparina
13. Citrato-fosfato-dextrose (CPD)
14. Corante de Giemsa (ver p. 296)

Observações

1. RPMI 1640 *(Powdered tissue culture medium*, Gibco, Paisley, Scotland).

2. Tampão HEPES 25mM (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfônico), Calbiochem, California, EUA.

3. Dissolver o $NaHCO_3$ em água destilada-deionizada e esterilizar através de filtro *Millipore* com 0,45µm de porosidade. Teste de esterilidade em tioglicolato de sódio (18 a 24 horas a 37°C). Armazenar a 4°C.

Meio de Cultura

RPMI 1640, pó	10,4g
Tampão HEPES	5,94g
Água destilada-deionizada	960ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Meio RPMI Completo

Dissolver 10,4g de RPMI 1640 em 900ml de água destilada-deionizada e adicionar 5,94g (25mM) de tampão HEPES. Completar o volume em 960ml com água destilada-deionizada. Adicionar 40mg/l de gentamicina, para inibir a contaminação bacteriana. Esterilizar o meio através de filtro *Millipore* com 0,22µm de porosidade. Distribuir em frascos de vidro com tampa de rosca (*screw-capped*) nas quantidades requeridas (100ml). Armazenar à temperatura de 4°C. Opcionalmente, o meio pode ser enriquecido com hipoxantina e L-glutamina (2mM). Suplementar o meio, no momento do uso, com 10% a 20% de plasma ou soro humano (grupo A ou AB) e adicio-nar 4,2ml de solução de hidrogenocarbonato de sódio a 5% (recentemente preparado), para manter o pH final entre 7,2 e 7,4). O meio assim preparado e pronto para o uso é denominado RPMI completo.

Preparação das Hemácias Normais para Renovação da Cultura

As hemácias humanas usadas no cultivo deverão ser do tipo A ou O, colhidos assepticamente com heparina ou citrato-fosfato-dextrose (CPD). O sangue total humano deve apresentar pesquisas negativas para anticorpos HIV e hepatites virais dos tipos B e C. O sangue total deve ser armazenado em CPD, na proporção de 14% (v/v), a 4°C. Esses eritrócitos poderão renovar as culturas por um tempo não superior a quatro semanas após a colheita conforme preconiza Jensen e Trager[3] e Capps e Jensen[1]. No momento do uso, centrifugar (500 x *g*/10min) uma alíquota de sangue, desprezar o plasma e a camada de leucócitos. Ressuspender e lavar as hemácias em três ciclos de centrifugação (500 x *g*/10min) com o meio RPMI completo, desprezando o sobrenadante.

Implantação da Cultura de *Plasmodium falciparum*

A implantação da cultura é feita a partir de sangue obtido de paciente portador de malária causada pelo *P. falciparum*, preferencialmente, com parasitemia superior a 0,2% ou com parasitos (cepas) criopreservados em nitrogênio líquido (-196°C). Colher, com tubo a vácuo heparinizado por punção venosa, 10ml de sangue. Centrifugar (400 x *g*/10min) o sangue total à temperatura ambiente e desprezar o plasma e a camada de leucócitos. Lavar os eritrócitos em dois ciclos de centrifugação (400 x *g*/10min), à temperatura ambiente, com o meio RPMI completo. Ressuspender os eritrócitos parasitados com igual volume de RPMI completo (v/v). Calcular a parasitemia pré-cultura pela preparação de duas lâminas (esfregaço delgado ou estirado) coradas pelo método de Giemsa. Ajustar a parasitemia inicial, entre 0,1% e 1%, diluindo eritrócitos parasitados com eritrócitos normais (não parasitados). Ressuspender esses eritrócitos com o meio RPMI completo para obter uma diluição final (hematócrito) entre 5% e 10%. Distribuir a suspensão em placas de Petri, novas, estéreis e descartáveis (Costar, IVF. *Culture Disk* cat. n.º 360) de 60 x 15mm (4ml) ou 100 x 15mm (8ml). Incubar à temperatura

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

de 37°C, em atmosfera de aproximadamente 5% de CO_2 e baixa oxigenação, a qual é conseguida pela queima de uma vela em dessecador[3].

Manutenção das Culturas

A manutenção das culturas é feita pela troca diária do meio de cultura RPMI completo e pelo acompanhamento da parasitemia através de esfregaços sangüíneos delgados (estirados) corados pelo método de Giemsa. As culturas devem ser diluídas com eritrócitos não-infectados quando a parasitemia atingir 10%. Parasitemias elevadas são prejudiciais para o desenvolvimento normal dos parasitos, devido ao acúmulo de metabólitos e variações no pH do meio[4].

CRIOPRESERVAÇÃO DE CEPAS DE *P. FALCIPARUM*

Quando o sistema de cultura do *P. falciparum* estiver estabelecido, é recomendada a criopreservação dos organismos em nitrogênio líquido (-196°C). Esse procedimento permite a manutenção de cepas sabidamente adaptadas em cultura, assim como a manutenção de grande quantidade de antígenos para uso futuro.

Técnica de Criopreservação descrita por Christofinis e Miller[2]

Congelação: Centrifugar (300 x *g*/10min) em tubo cônico com tampa de 15mI, o sangue total infectado colhido de doente com malária por *P. falciparum* ou o sangue do meio de cultura, com parasitemia entre 3% e 5%, com predominância de formas jovens (trofozoítos). Desprezar o sobrenadante. Ressuspender as células com igual volume da solução crioprotetora de DMSO a 20% a qual deve ser preparada no momento do uso. A suspensão final, após suave homogeneização, deve ser distribuída nos volumes requeridos em tubos de plástico para criopreservação (Biofreeze® Vials, Costar, cat n.º 2028). Imediatamente após, colocar no botijão com nitrogênio líquido (-196°C).

Solução Crioprotetora de DMSO a 20% (v/v)

Dimetilsulfóxido (DMSO)	20ml
Meio RPMI completo	80ml

Descongelação: Retirar os criotubos do botijão criobiológico, com nitrogênio líquido. Deixar as cepas à temperatura ambiente até que ocorra a descongelação total do conteúdo dos criotubos. Centrifugar (500 x *g*/10min) o material descongelado. Desprezar o sobrenadante e ressuspender com cuidado o sedimento com igual volume de solução de cloreto de sódio a 3,5%. Após, lavar os eritrócitos em dois ciclos de centrifugação (500 x *g*/10min) com o meio RPMI completo.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Técnica de Criopreservação descrita por Meryman & Hornblower[5]

Congelação: Centrifugar (400 x *g*/10min) em tubo cônico com tampa de 15ml, sangue total infectado colhido de doente com malária por *P. falciparum* ou o sangue colhido do meio de cultura com parasitemia superior a 2% e com predominância de formas jovens (trofozoítos). Desprezar o sobrenadante e medir o volume do sedimento. Para cada 1ml do sedimento adicionar 1,7ml da solução criopreservadora de glicerol a 57%, gota a gota, com agulha calibre 21 (*gauge*) com agitação lenta. Acrescentar 20% do volume da solução requerida e após repouso de cinco minutos, adicionar os restantes 80%. Distribuir a suspensão final nos volumes requeridos em tubos de plástico para criopreservação e transferi-los imediatamente após para *freezer* a -70°C, mantendo-os por um período indeterminado (inferior a 24 horas). Armazenar os criotubos em botijão com nitrogênio líquido (-196ºC).

Solução Crioprotetora de Glicerol a 57% (v/v)

Glicerol	57ml
Meio RPMI sem soro	43ml

Descongelação: Retirar os criotubos do botijão criobiológico, com nitrogênio líquido, em banho de gelo, colocando-os em banho de água à temperatura de 37°C, deixar nessa temperatura o tempo necessário à descongelação. Em condições de assepsia total, transferir o material descongelado para tubo de centrífuga com tampa. Adicionar, gota a gota, com agitação lenta, para cada ml do sedimento, igual volume de solução de cloreto de sódio a 12%. Manter a suspensão em repouso durante cinco minutos e após adicionar, gota a gota, 10ml de solução de cloreto de sódio a 1,6%. Centrifugar (200 x *g*/10min), desprezar o sobrenadante e adicionar, gota a gota, ao sedimento, com agitação lenta, 10ml de solução glicosada a 0,2% em solução de cloreto de sódio a 0,9%. Centrifugar e desprezar o sobrenadante. Após, lavar os eritrócitos em dois ciclos de centrifugação (200 x *g*/10min) com o meio RPMI completo.

Solução Glicosada a 0,2% em Solução de Cloreto de Sódio a 0,9%

Solução de cloreto de sódio a 0,9%	100ml
Glicose	0,2g

Controle de Qualidade (CQ): Cultivo de *P. falciparum*

1. Controlar semanalmente e sempre que forem usados o meio RPMI 1640 completo, o meio RPMI sem plasma e a solução de hidrogenocarbonato de sódio a 5%. Realizar testes de esterilidade em tioglicolato de sódio (18 a 24 horas a 37°C).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

2. Os meios não devem apresentar sinais de precipitação e nenhuma contaminação visível por bactérias e/ou fungos.

3. Manter as culturas de *P. falciparum* sabidamente adaptadas em cultura, criopreservadas em nitrogênio líquido (-196ºC).

4. Realizar teste de esterilidade do plasma ou do soro em tioglicolato de sódio (18 a 24 horas a 37°C) sempre que forem usados.

5. O plasma e os eritrócitos devem ser do mesmo grupo sangüíneo.

6. Seguir o controle de qualidade do método de Giemsa.

7. Controlar quinzenalmente o volume do nitrogênio líquido (-196ºC).

8. O microscópio deve ser calibrado a cada 12 meses. As objetivas e as oculares usadas na calibração devem ser mantidas em todas as contagens realizadas com o microscópio. Os resultados do CQ devem ser apropriadamente registrados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Capps TC, Jensen JB. Storage requirements for erythrocytes used to culture *Plasmodium falciparum*. J Parasitol 69:158-162, 1983.
2. Christofinis GJ, Miller H. A simplified method for cryopreservation of *Plasmodium falciparum* from continuous in vitro cultures. Ann Trop Med Parasitol 77:123-126, 1983.
3. Jensen JB, Trager W. Plasmodiurn falciparum in cultures: use of outdated erythrocytes and description of the Candle Jar Method. J Parasitol 63:883-886, 1977.
4. Jensen MD, Conley M, Helstowski LD. Culture of *Plasmodiurn falciparum*: the role of pH, glucose, and lactate. J Parasitol 69:1060-1070, 1983.
5. Meryman HT, Hornblower M. A method for freezing and washing red blood cell using a high glycerol concentration. Transfusion 12:145-156, 11972.
6. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. Science 193:673-675, 1976.
7. Trager W. Cultivation of malaria parasites. Br Med Bull 38:129-131, 1982.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CAPÍTULO 25



Trichomonas vaginalis

Geraldo Attilio De Carli
Tiana Tasca

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A cultura é o método mais sensível para o diagnóstico da tricomoníase; entretanto, são necessários três a quatro dias para determinar os seus resultados. Muitos meios de cultura líquidos ou semi-sólidos têm sido descritos para isolamento e manutenção axênica do *T. vaginalis*. Depois que foi possível cultivar amostras de tricomonas pela adição de penicilina e estreptomicina aos meios, o diagnóstico, o isolamento e a manutenção dos tricomonas tornaram-se fáceis e as culturas puderam ser padronizadas, facilitando o diagnóstico laboratorial da tricomoníase e o controle dos resultados da terapêutica. O cultivo é o mais sensível método de diagnóstico (ver Tabela 8.1), particularmente quando o número de tricomonas é muito pequeno nos espécimes enviados ao laboratório de diagnóstico. O laboratório deve, obrigatoriamente, empregar rotineiramente o cultivo para o diagnóstico da tricomoníase. Desde que os exsudatos, e outras secreções podem conter formas não-viáveis de tricomonas, o cultivo das amostras pode permitir resultados negativos. Nessas circunstâncias, o exame direto a fresco é mais sensível do que a cultura. Entretanto, quando poucos mas viáveis organismos estão presentes, o oposto é verdadeiro. As afirmações anteriores não são surpreendentes, visto que o maior rendimento em diagnóstico é obtido quando uma combinação de métodos é usada.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

MEIOS DE CULTURA

Os principais meios de cultura usados são: o de Johnson e Trussell[12]; Trussell e Johnson (CPLM)[21]; o de Kupferberg, Johnson e Sprince (STS)[14]; o de Diamond (TYM)[4]; o de Feinberg-Whittington (FW)[8]; o TYM modificado por Hollander[9] e Kulda e cols.[13]; o de Lowe[18,19] e o meio CMRL 1055 modificado por Linstead[15-17].

O *T. vaginalis* é um organismo anaeróbio facultativo. Cresce perfeitamente bem na ausência de oxigênio em faixa de pH compreendida entre 5,0 e 6,0 e em temperaturas entre 20 e 40°C. Todos os meios têm em comum os seguintes componentes: a) nutrientes: extrato de fígado, ou extrato de levedo, ou triptona (*tryptone*), ou tripticase (*tryptic digest of casein*), ou peptona (*bacto peptone*); b) agentes de redução (potencial redox): cloridrato de L-cisteína, ácido ascórbico ou ácido glutâmico, ou tioglicolato de sódio; c) fonte de energia (carboidratos): glicose ou maltose; d) sais tampões: fosfatos (ou salina não tamponada ou soluções tipo-Ringer); e) soro (1-20%) de cavalo ou de bovino ou de bezerro: como suprimento de lipídios (ácidos graxos e colesterol)[10,17]; f) estimulação da multiplicação celular: ácido ascórbico, ou ácido glutâmico, ou colina; g) ágar (0,05-1%) para a redução lenta da difusão do oxigênio e para estabilização da suspensão de colesterol. As culturas axênicas são obtidas pela associação da penicilina (1.000Ul/ml) e do sulfato de estreptomicina (1mg/ml)[1]. Entretanto, no caso de bactérias resistentes, a gentamicina (200-400µg/ml), a floxacilina (500µg/ml), a neomicina (500µg/ml) e o cloranfenicol (250µg/ml) poderão também ser utilizados em associação ou isoladamente. O micoplasma (*Micoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*) é muito comum na vagina, e poderá ser eliminado das culturas pela adição de canamicina (100µg/ml) ou de tilosina (60-120µg/ml). Os fungos também estão presentes no material clínico, e são excluídos das culturas com a nistatina (50Ul/ml), com a anfotericina B (15µg/ml) ou com o nitrato de miconazol (50-100µg/ml)[17]. Apesar de muitos pesquisadores discutirem os méritos dos diferentes meios de cultura, realmente não existem evidências absolutas se um meio é superior ao outro nos propósitos de diagnóstico. Vários parasitologistas estudaram a capacidade dos meios em isolar o flagelado. Quando o meio é usado para o diagnóstico, o ágar é mantido[2]. Porém, para a preparação de células em experimentos na bioquímica, na fisiologia, no estudo do metabolismo, na imunologia ou em ultra-estrutura, o ágar pode ser suprimido[10,11].

REAGENTES

1. *Trypticase* (BBL)
2. *Tryptone* (Difco)
3. *Tryptose* (Difco)
4. Peptona (Difco)
5. Infusão de fígado (Difco Bacto 0269)
6. *Bacto liver*, pó (Difco)
7. *Panmede* (digesto de fígado)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

8. Extrato de levedo (Difco/BBL)
9. CMRL 1066, 10X concentrado (Gibco)
10. HEPES/KOH
11. Extrato *fildes* (digesto péptico de sangue) (Oxoid)
12. Glicose ($C_6H_{12}O_6$) (Merck)
13. Maltose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Difco ou Merck)
14. Ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) (Merck)
15. L-cisteína, cloridrato ($C_3H_7NO_2S.HCl$) (Merck)
16. Citrato de ferro amoniacal
17. Cloreto de sódio (NaCl)
18. Cloreto de potássio (KCl)
19. Cloreto de cálcio ($CaCl_2$)
20. Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)
21. Hidrogenofosfato dipotássico (K_2HPO_4)
22. Hidrogenocarbonato de potássio ($KHCO_3$)
23. Hidrogenocarbonato de sódio ($NaHCO_3$)
24. Sulfato de ferro II ($FeSO_4.7H_2O$)
25. Azul-de-metileno (CI 52015-Sigma) ($C_{16}H_{18}ClN_3S.3H_2O$)
26. Anfotericina B (*Fungizon*)
27. Cloranfenicol
28. Gentamicina
29. Neomicina
30. Nistatina
31. Penicilina G potássica
32. Sulfato de estreptomicina
33. Ágar (Difco Bacto)
34. Soro de cavalo, bovino ou ovino inativado

Meio *Trypticase-Yeast Extract-Maltose* (TYM)

O meio *Trypticase-Yeast Extract-Maltose* (TYM) foi descrito por Diamond em 1957[4].

Trypticase ou *Tryptone*	20g
Extrato de levedo	10g
Maltose	5g
L-cisteína, cloridrato	1g
Ácido ascórbico	0,2g
Hidrogenofosfato dipotássico	0,8g
Diidrogenofosfato de potássio	0,8g
Ágar	0,5g

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Água destilada-deionizada	900ml
pH 6,0	

Preparação

1. Dissolver os sais tampão em 600ml de água. Acrescentar e dissolver os ingredientes remanescentes na ordem apresentada, com exclusão do ágar; ajustar o pH em 6,0 com solução de NaOH 1M ou HCl 1M e adicionar o ágar.

2. Distribuir o meio em tubos com rosca *(screw-capped)* 16 x 150mm (Pyrex n.º 9825), à razão de 9ml por tubo e autoclavar (121°C/15min).

3. Deixar esfriar (45°C) e suplementar com 10% (v/v) de soro de cavalo ou de bovino ou de ovelha, estéril e inativado (56°C/30min). Após, acrescentar 1.000UI/ de penicilina G potássica e 1mg/ml de sulfato de estreptomicina.

4. Incubar o meio completo durante a noite, a 37°C, para teste de esterilidade. Armazenar o meio completo à temperatura de 4 a 5°C até 10 dias.

5. Rotular o meio TYM com as datas de preparação e de validade.

6. Diamond[4,6] recomenda suplementar o meio com 10% de soro de ovino ou de bovino. Em nosso laboratório obtivemos excelentes resultados com soro de cavalo, de bovino ou de búfalo a 10%.

7. Todas as transferências devem ser realizadas em condições de assepsia total[1,5-7].

Meio *Trypticase-Yeast Extract-Maltose* (TYM) Modificado por Klass

O meio *Trypticase-Yeast Extract-Maltose* (TYM) foi modificado por Klass[22]

Trypticase	24g
Extrato de levedo	12g
Maltose	6g
L-cisteína, cloridrato	1,2g
Ácido ascórbico	0,24g
Água destilada-deionizada	900ml
pH 6,0	

Mistura de Antibióticos

Penicilina G potássica	1.000.000UI
Sulfato de estreptomicina	1.000.000µg
Anfotericina B (*Fungizon*)	2.000µg
Água destilada-deionizada	50ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

• Dissolver os antibióticos em água-deionizada. A concentração da solução preparada é a seguinte:

Penicilina G potássica	20.000UI/ml
Sulfato de estreptomicina	20.000μg/ml
Anfotericina B	40μg/ml

• Transferir para tubos com rosca ou criotubos estéreis 1ml da solução de antibióticos. Rotular a solução de antibióticos com as datas de preparação e de validade. Armazenar a -20ºC.

Preparação

1. Dissolver os ingredientes na ordem apresentada, em água. Ajustar o pH em 6,0 com solução de NaOH 1M ou HCl 1M.

2. Distribuir o meio em tubos com rosca (*screw-capped*) 16 x 150mm (Pyrex n.º 9825), à razão de 12,5ml por tubo e autoclavar (121ºC/15min). Deixar esfriar (50ºC) e suplementar com 1ml de soro de cavalo, ou de bovino, ou de ovelha ou de búfalo estéril e inativado (56ºC/30min) e 0,5ml da mistura de antibióticos, para cada tubo. Incubar o meio completo durante a noite, a 37ºC, para teste de esterilidade.

3. Rotular o meio TYM com as datas de preparação e de validade (três semanas). Armazenar o meio completo à temperatura de 4-5ºC.

4. Todas as transferências devem ser realizadas em condições de assepsia total.

Meio *Trypticase-Yeast Extract-Maltose* (TYM) Modificado por Kulda e Hollander

O meio *Trypticase-Yeast Extract-Maltose* foi modificado por Kulda e cols. (1970) e por Hollander (1976)[9,13].

Trypticase	20g
Extrato de levedo	10g
Maltose	5g
Ácido ascórbico	1g
Cloreto de potássio	1g
Hidrogenocarbonato de potássio	1g
Hidrogenofosfato dipotássico	1g
Diidrogenofosfato de potássio	1g
Sulfato de ferro II	0,18g
Água destilada-deionizada	900ml

pH 6,0

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Preparação

1. Dissolver os ingredientes, com agitação, em água quente. Deixar esfriar e ajustar o pH, se necessário, com NaOH 1M ou HCl 1M.

2. Distribuir nos volumes requeridos e autoclavar (121ºC/15min).

3. Antes do uso, suplementar com 10% (v/v) de soro de cavalo, estéril e inativado (56ºC/30min). Após, acrescentar 1.000UI/ml de penicilina G potássica e 1mg/ml de sulfato de estreptomicina.

4. Incubar o meio completo, durante a noite, a 37ºC, para teste de esterilidade. Todas as transferências devem ser realizadas em condições de assepsia total. Armazenar o meio completo à temperatura de 4-5ºC até 10-15 dias.

Meio *Simplified-Trypticase-Serum* (STS)

O meio *Simplified-Thypticase-Serum* (STS) foi descrito por Kupferberg, Johnson e Sprince em 1948[14].

Trypticase	20g
L-cisteína, cloridrato	1,5g
Maltose	1g
Ágar	1,0 g
Água destilada-deionizada	950ml
pH 6,0	

Preparação

1. Dissolver os componentes em água e ajustar o pH em 6,0 com NaOH 1M ou HCl 1M.

2. Adicionar o ágar e aquecer em banho de água até a completa dissolução, se necessário, acrescentar 0,6ml de azul-de-metileno a 0,5% (m/v), como indicador de redução.

3. Ajustar o volume e distribuir o meio em tubos com rosca *(screw-capped)*16 x 150mm (Pyrex n.º 9825), à razão de 10ml por tubo e autoclavar (121ºC/15min). Deixar esfriar (45ºC) e suplementar com 10% (v/v) de soro de cavalo, ou de bovino, ou de búfalo, ou de ovelha, estéril e inativado (56ºC/30min). Após, acrescentar 1.000UI/ml de penicilina G potássica e 1mg/ml de sulfato de estreptomicina.

4. Incubar o meio completo durante a noite, a 37ºC, para teste de esterilidade. Armazenar o meio completo à temperatura de 4-5ºC até 10 dias.

5. Todas as transferências devem ser realizadas em condições de assepsia total. O ágar neste meio é essencial, não devendo ser omitido.

Meio *Cysteine-Peptone-Liver-Maltose* (CPLM)

O meio *Cysteine-Peptone-Liver-Maltose* (CPLM) foi descrito por Johnson e Trussell (1943) e por Trussell e Johnson (1945)[12,21].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Peptona	32g
Ágar	1,6g
L-cisteína, cloridrato	2,4g
Maltose	1,6g
Infusão de fígado	320ml
Solução de Ringer	960ml

pH 6,0

Infusão de fígado

Preparação

Bacto *Liver*, pó	20g
Água destilada-deionizada (MQP)	330ml

1. Misturar, em um *beaker*, o Bacto *Liver* e a água. Aquecer durante uma hora à temperatura de 50ºC.

2. Elevar a temperatura para 80ºC por cinco minutos, para coagular as proteínas.

3. Deixar esfriar e filtrar em papel Whatman n.º 1 com funil de Büchner.

Solução de Ringer (Segundo Visvesvara)

Cloreto de sódio	0,6g
Hidrogenocarbonato de sódio	0,01g
Cloreto de potássio	0,01g
Cloreto de cálcio	0,01g
Água destilada-deionizada	100ml

Preparação

Dissolver os ingredientes na ordem em 90ml de água-deionizada e completar o volume de 100ml.

Solução de Azul-de-Metileno

Azul-de-metileno	0,5g
Água destilada-deionizada	100ml

Preparação do Meio Completo

1. Misturar a infusão de fígado e a solução de Ringer. Adicionar os outros componentes e dissolver individualmente pela agitação e aquecimento em banho de água.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Adicionar 0,7ml de azul-de-metileno a 0,5% (m/v). Ajustar o pH em 6,0 com NaOH 1M ou HCl 1M. Autoclavar (121ºC/15min), imediatamente antes do uso suplementar com 10% (v/v), de soro de cavalo ou de bovino ou de ovelha ou de búfalo estéril e inativado (56ºC/30min) e acrescentar 1.000UI/ml de penicilina G potássica e 1mg/ml de sulfato de estreptomicina.

3. Incubar o meio completo, durante a noite, a 37ºC, para teste de esterilidade.

4. Todas as transferências devem ser realizadas em condições de assepsia total.

Meio de Feinberg e Whittington (FW)

O meio de Feinberg e Whittington (FW) foi descrito em 1957[8].

Panmede (digesto de fígado)	25g
Cloreto de sódio	6,5g
Dextrose	5g
Soro de cavalo inativado (56ºC/30min)	180ml
Água destilada-deionizada	1.000ml
Penicilina G potássica	1.000.000UI
Sulfato de estreptomicina	500mg

pH 6,4

Preparação

1. Dissolver os componentes sólidos em água-deionizada e adicionar o soro. Ajustar o pH em 6,5 com solução de NaOH 1M.

2. Esterilizar a mistura por filtração em *Seitz* ou *Millipore*. Distribuir nos volumes requeridos.

3. Incubar o meio completo, durante a noite, a 37ºC, para teste de esterilidade.

4. Armazenar à temperatura de 4-5ºC até três meses.

Meio *Cysteine-Tryptose-Liver-Maltose* (CTLM)

American Type Culture Collection (ATCC) n.º 745

Infusão de fígado (Difco n.º 0269)	250ml
10X solução de Ringer	75ml
Tryptose (Difco n.º 0124)	25g
L-cisteína, cloridrato	1,75g
Maltose	1,25g
Ácido ascórbico	0,25g
Hidrogenocarbonato de sódio	0,075g

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Ágar	1,15 g
Água destilada-deionizada	675 ml

pH 6,0

Preparação

Infusão de Fígado

Ver p. 458, preparação do Meio CPLM.

Solução de Ringer 10X (segundo ATCC)

Cloreto de sódio	9g
Cloreto de potássio	0,42g
Cloreto de cálcio	0,24g
Água destilada-deionizada	100ml

Preparação

Dissolver os ingredientes na ordem em 90ml de água-deionizada e completar o volume de 100ml.

Preparação do Meio Completo

1. Dissolver os componentes sólidos em água destilada deionizada e aquecer para dissolver o ágar. Ajustar o pH com solução de NaOH 1M ou HCI 1M.

2. O meio é distribuído em tubos com rosca *(screw-capped)* 16 x 125mm, à razão de 9,5ml por tubo e autoclavar (121ºC/15min). Deixar esfriar (45ºC) e adicionar, assepticamente, 0,5ml de soro de cavalo estéril e inativado (56ºC/30min).

3. Incubar o meio completo, durante a noite, a 37ºC, para teste de esterilidade.

4. Armazenar à temperatura de 4-5ºC até um mês.

Meio Semi-Sólido de Lowe para Diagnóstico e Transporte

O meio semi-sólido de Lowe para diagnóstico e transporte foi descrito por Lowe (1972) e por Diamond em 1983[6,19].

Meio Básico

Panmede (digerido de fígado)	12,5g
Cloreto de sódio	2,5g

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Maltose	0,5g
Ágar	1,25g
Água destilada-deionizada q.s.p.	500ml
pH 6,2	

Preparação do Meio

1. Dissolver os três primeiros ingredientes em água destilada. Adicionar o ágar. Ajustar o pH em 6,2. Esterilizar pelo vapor fluente (100ºC) durante 90 minutos.

2. Agitar vigorosamente em intervalos.

3. Deixar esfriar a 54ºC e adicionar assepticamente uma das seguintes soluções estéreis (A ou B):

A. Segundo Lowe[18]

Soro de cavalo (inativado a 56ºC/30min)	50ml
Extrato *fildes* (digesto péptico de sangue)	0,5ml
Solução aquosa de cloranfenicol a 0,1% (m/v)	5ml
Solução aquosa de sulfato de estreptomicina a 1% (m/v)	5ml
Solução aquosa de neomicina a 1% (m/v)	5ml
Solução aquosa de nistatina a 0,5% (m/v)	10ml

B. Segundo Diamond[6]

Soro de cavalo (inativado a 56ºC/30min)	50ml
Extrato *fildes* (Oxoid)	0,5ml
Solução aquosa de ácido ascórbico a 4% (m/v)	10ml
Solução aquosa de cloranfenicol a 1% (m/v)	5ml
Solução aquosa de gentamicina a 1% (m/v)	5ml
Solução aquosa de anfotericina B a 0,01% (m/v)	5ml

Meio Completo

1. Agitar e distribuir assepticamente nos volumes requeridos. Incubar o meio completo, durante a noite, a 37ºC.

2. Para teste de esterilidade, o meio deverá permanecer intacto quando o frasco for invertido.

3. Armazenar a 4-5ºC até 15 dias. A ação geleificante do ágar varia de preparação para preparação.

4. O ágar do meio deverá romper-se imediatamente pela agitação. A concentração do ágar deverá ser ajustada para apresentar esta condição.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

MEIO *CONNAUGHT MEDICAL RESEARCH LABORATORY* 1066 (CMRL MODIFICADO)

O meio CMRL foi modificado por Linstead (1981)[16].

CMRL 1066 (Gibco) 10 X concentrado	100ml
HEPES/KOH 1M, pH 7,4	20ml
Glicose 9% (m/v)/ ácido ascórbico a 1% (m/v)	100ml
Citrato de ferro amoniacal, 3 g/l (m/v)	10ml
Água destilada-deionizada	770ml

pH 6,0

Preparação

1. Ajustar, se necessário, o pH em 6,0 com NaOH 1M ou HCI 1M. Filtrar em membrana filtrante *Millipore* (0,22μm); osmolaridade final, 248mOsm.

2. Adicionar ao meio, antes do uso, soro fetal de bezerro na concentração final de 8% (v/v).

3. Diamond[3] armazena este meio a 4ºC até duas semanas ou por três meses a -20ºC, enquanto Linstead (1989) aconselha preparar o meio antes do uso.

Observações

1. Em nosso laboratório é usado o meio de Diamond (TYM)[4], anteriormente descrito, suplementado com 10% (v/v) de soro de cavalo ou de bovino inativado.

2. A canamicina (100μg/ml) e a nistatina (50UI/ml) são adicionadas ao meio para os isolamentos nos exsudatos vaginais e emprega-se somente canamicina (100μg/ml) para os isolamentos nas secreções uretrais de homens.

3. O meio é distribuído em tubos com rosca *(screw-apped)* 16 x 150mm, à razão de 9ml por tubo.

4. O meio é autoclavado (121ºC/15min) e incubado a 37ºC durante 24 horas para o teste de esterilidade. Após, é estocado à temperatura de 5ºC, até 10 dias.

5. Imediatamente antes do uso, é adicionado 1ml de soro de cavalo ou de bovino não-diluído, estéril e inativado (56ºC/30min); penicilina G potássica (1.000UI/ml) e sulfato de estreptomicina (1mg/ml).

6. Os tubos são agitados a fim de obter uma perfeita homogeneização, permanecendo após 30 minutos à temperatura de 37ºC para estabilizar a temperatura do meio.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

7. As culturas são incubadas a 37ºC e examinadas diariamente até cinco dias.

8. Todas as inoculações são realizadas em condições de assepsia total.

Procedimentos de Inoculação em Meios de Cultura

Amostras

Homem: Secreção uretral, primeira urina matinal (com ou sem massagem prostática), sêmen ou raspado da mucosa uretral.

Mulher: Exsudato vaginal coletado do (fórnix) posterir com *swabs* de algodão não-absorvente ou secreção genital coletada com esponja de poliéster ou a primeira urina matinal.

Método

1. Usar luvas durante todas as etapas do exame cultural.

2. Retirar da geladeira (4 a 5ºC) os tubos contendo o meio de cultura. Agitar os tubos a fim de se obter uma perfeita homogeneização, permanecendo uma a duas horas à temperatura de 37ºC para estabilizar a temperatura do meio.

3. Agitar vigorosamente no meio de cultura a porção do *swab* contendo a amostra colhida do paciente.

4. Quando a amostra for colhida com *swab* de esponja de poliéster, deixar a esponja no meio e agitar o tubo.

5. Centrifugar a amostra de urina (250 x *g*/10min), aspirar o sobrenadante e inocular o sedimento no meio.

6. Examinar os tubos diariamente por vários dias (cinco dias) e fazer novo repique se necessário. Para repicar, primeiro agitar o tubo para distribuir uniformemente os organismos e remover 1 a 2ml e inocular em um tubo fresco e quente (37ºC). Todas as transferências devem ser realizadas em condições de assepsia total (capela de segurança biológica de fluxo laminar vertical).

7. Os tubos podem ser incubados na posição inclinada (ângulo de 45º a 37º).

8. Incubar os tubos-controle e aqueles contendo o material do paciente.

9. Examinar toda a extensão do tubo durante 72 a 120 horas.

10. Os resultados não deverão ser relatados como negativos antes de 120 horas.

Controle de Qualidade

1. Verificar os reagentes e os meios de cultura (pelo menos uma vez por semana). Todos os meios de cultura, inclusive a solução de Ringer, de-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

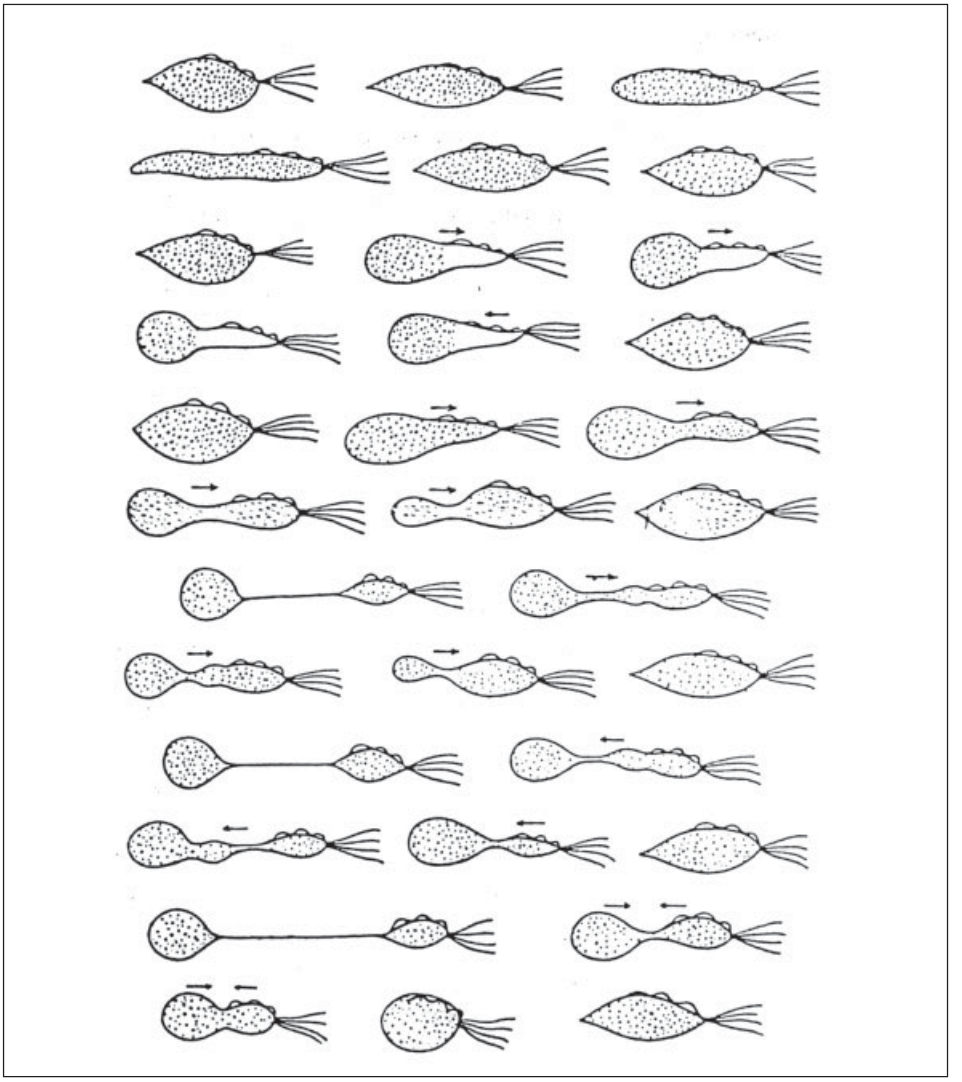


Fig. 25.1 — *Tipos de movimentação de* Trichomonas vaginalis *em meio viscoso (Segundo Barreto MP, Zago Filho H. Comportamento de* Trichomonas vaginalis *Donné, 1837 e de* Trichomonas tenax *(Müller OF, 1773) em meio de cultura viscoso. Rev Brasil Biol 17:501-508, 1957).*

vem estar isentos de precipitação e contaminação por bactérias e/ou fungos.

2. Calibrar o microscópio e realizar a morfometria com micrômetro ocular.

3. Manter criopreservada uma cultura padrão de *T. vaginalis* (ATCC 30.001). Cultivar semanalmente essa cepa.

4. No mesmo momento em que os espécimes dos pacientes são inoculados, semear em um novo meio fresco a cepa padrão. Se os organismos dessa cultura se reproduzirem e se mantiverem viáveis por 96 horas, reportar os resultados da cultura do paciente.

5. Corar, pelo método de Giemsa, uma lâmina preparada com a cultura padrão, em paralelo com a lâmina do material colhido do paciente. Os resultados são aceitos somente quando o controle dos organismos estiver bem corado[22].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Observação

1. A cultura é o método mais sensível de diagnóstico da tricomoníase. Conseqüentemente, todo empenho deverá ser feito para que todas as amostras de pacientes sejam inoculadas em meios de cultura.

2. Entretanto, desde que esse método necessita de três a quatro dias para o crescimento dos flagelados e, ocasionalmente, as amostras podem conter organismos não-viáveis, é de extrema importância a realização simultânea do exame microscópico pelo exame direto a fresco e/ou de esfregaços corados (método de Giemsa).

3. Quando os organismos são encontrados antes ou no fim de 96 horas, reportar a pesquisa como positiva (p. ex.: positivo para *Trichomonas vaginalis).* Quando os trofozoítos não são vistos depois de quatro dias de incubação, desprezar os tubos e reportar o resultado como negativo (p. ex.: negativo para *Trichomonas vaginalis).* Usar sempre o mesmo meio de cultura para o controle de qualidade e para a inoculação do espécime coletado do paciente (Fig. 25.1).

*InPouch*TV™

O *InPouch*TV™, desenvolvido pela *Biomed Diagnostics* (Biomed Diagnosis, São José, Ca, EUA), é um meio de cultura seletivo para o diagnóstico da tricomoníase humana. Este novo método é simultaneamente um sistema de transporte e de cultivo do parasito. A bolsa é de plástico, construída com folhas finas, claras e transparentes. Cada bolsa é dividida em duas câmaras com formato em "V", as quais são separadas por um canal, que só permite a passagem do meio entre elas, quando pressionadas. A câmara inferior contém 4ml de meio seletivo, que é inibitório para leveduras e bactérias. O *InPouch*TV™ suprime, mas não elimina totalmente, o crescimento das leveduras. Um pequeno volume do meio é deslocado sob pressão da câmara inferior para a superior. O meio é composto pelos seguintes ingredientes: *trypticase*, proteose peptona, extrato de levedo, maltose e outros açúcares, aminoácidos, sais, antibióticos e antifúngico, dissolvidos em solução salina tamponada com fosfatos. Um adaptador tipo grampo, colocado na parte superior da câmara, é usado para fechar a bolsa. A secreção vaginal colhida com *swab* estéril, amostras uretrais e o sedimento de 15ml de urina de homens também são usadas como inóculo.

Os espécimes, após a colheita, são misturados ao meio na câmara superior (Fig. 25.2A). As amostras não devem ser refrigeradas ou congeladas. Um inóculo contendo de um a 10 organismos é suficiente para positivar o teste. Antes de os espécimes serem introduzidos no meio de cultura da câmara inferior, a bolsa deve ser incubada na posição vertical, durante 30 minutos a 37ºC e, após, examinada ao microscópio com pequeno aumento (10X), buscando a presença de tricomonas. Esse procedimento substitui o exame das preparações a fresco em solução salina isotônica (0,15M). A mistura é pressionada e impulsionada para dentro da câmara inferior e a parte superior da câmara é selada (Fig. 25.2B). Após a incubação, na posição vertical, 24 horas a 37ºC, a parte inferior e o lado de junção da bolsa devem

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

ser vigorosamente massageados. Esse procedimento liberta os tricomonas presos ao meio. Para facilitar a observação, é colocada uma armação de plástico sobre a parte inferior da bolsa antes do exame microscópico (Fig 25.2C), o que permite colocar a bolsa sobre a platina do microscópio e imobilizar o meio para facilitar o exame. Os organismos poderão ser concentrados, deixando a bolsa na posição vertical durante 15 minutos antes da observação microscópica. Os tricomonas são reunidos no fundo da câmara inferior e o adaptador de plástico, colocado nesse local, facilita a pesquisa. A observação microscópica deverá ser realizada com pequeno aumento e, se necessário, com aumento de 40X para confirmar o diagnóstico (Fig. 25.2D). Os espécimes negativos deverão ser novamente incubados com leituras diárias de até cinco dias. As culturas positivas poderão ser mantidas pela inoculação de 60µl de cultura com bom crescimento para uma nova bolsa. As subculturas se mantêm por cinco dias a duas semanas. O meio não deve ser congelado. O *InPouch*TV™ deve ser estocado na posição vertical, no escuro e à temperatura ambiente (15-25ºC). Borchardt e Smith[3] concluíram que o *InPouch*TV™ oferece muitas vantagens quando comparado com os outros procedimentos de rotina usados pelos laboratórios de diagnóstico. A bolsa apresenta uma estabilidade de seis meses à temperatura ambiente e a versatilidade de poder ser usada como um meio de transporte e de cultura. Os espécimes poderão ser enviados pelo Correio, mantendo os tricomonas viáveis por aproximadamente uma semana. Somente são necessários um adaptador de plástico e um microscópio para a leitura da cultura, sendo eliminada, assim, a preparação de lâminas. As mais importantes vantagens do *InPouch*TV™ são sua eficácia, sensibilidade e especificidade.

CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação[20] é um importante procedimento para a manutenção de cepas de *Trichomonas vaginalis* por períodos indeterminados de tempo. O armazenamento em nitrogênio líquido (-196ºC) fornece segurança contra perdas causadas por contaminação ou acidentes, eliminando a possibilidade de possíveis problemas relacionados com a mudança da patogenicidade e das características antigênicas, durante repetidas subculturas *in vitro.* Quando um grande número de amostras é mantido para estudo, a criopreservação

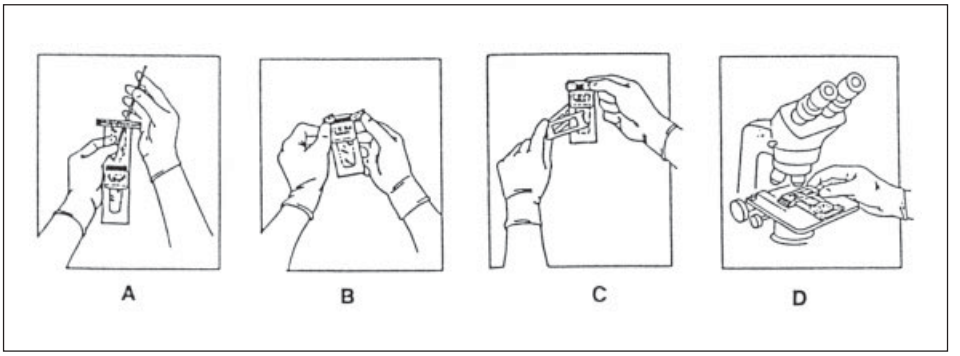


Fig. 25.2 — InPouchTV™ *(Biomed Diagnostic, 1743, Hudson Dr., São José, Ca, EUA).*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

reduz o risco da contaminação cruzada e da não-identificação dos organismos isolados. Os tricomonas são estocados, mergulhados, em nitrogênio líquido (-196ºC) ou na fase de vapor (nitrogênio líquido acima mencionado) (-170ºC), em criotubos hermeticamente fechados para prevenir a entrada da fase líquida. A razão de congelação para essas temperaturas é um importante requisito para a sobrevivência das cepas. Diferentes razões de congelação foram descritas por diferentes pesquisadores, as quais variaram de 1 a 8ºC/min. O método descrito por McMillan (1990) e Linstead (1990) é indicado para a criopreservação de protozoários dos gêneros *Trichomonas* e *Tritrichomonas*. Nesses procedimentos são usados dimetilsufóxido (DMSO) e/ou glicerol como crioprotetores e uma razão de congelação de 1ºC/min.

Meios, Reagentes e Material

1. Meio de Diamond (*Trypticase-Yeast Extract-Maltose*, TYM)
2. Dimetilsulfóxido (DMSO) (C_2H_6SO) (Merck)
3. Glicerol ($C_3H_5(OH)_3$) (Merck)
4. Acetona (C_3H_6O)
5. Gelo seco, dióxido de carbono (CO_2) sublimado
6. Nitrogênio líquido
7. Termômetro com escala até -50ºC

Organismos

Culturas axênicas de tricomonas com 48 horas de crescimento.

Solução Criopreservadora a 5% (v/v)

Dimetilsulfóxido (DMSO)	5ml
Meio de Diamond (TYM)	95ml

Congelação

1. Transferir para criotubos (*Biofreeze™ Vials*, Costar cat. n.º 2027 ou 2028), 1ml da solução DMSO + TYM e 1ml de cultura axênica de 48 horas de protozoários dos gêneros *Trichomonas* ou *Tritrichomonas*.

2. Imergir em acetona, com fragmentos de gelo seco, os criotubos presos a um bastão de vidro.

3. Com agitação uniforme e contínua no sentido horário, baixar 1ºC/min, até atingir a temperatura de -40ºC.

4. Mergulhar, imediatamente após, os criotubos em nitrogênio líquido (-196ºC).

5. Armazenar os criotubos em botijão criobiológico (Taylor-Wharton-35 VHC) com nitrogênio líquido.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Descongelação

1. Retirar os criotubos do botijão criobiológico, com nitrogênio líquido, colocando-os em banho de água à temperatura de 37ºC/30min.

2. Transferir, imediatamente, a mistura DMSO + TYM + células para o meio de cultura TYM e incubar a 37ºC durante 48 a 72 horas.

3. Contar na câmara de Thoma o número de células mortas em relação às vivas.

Observações

1. O método de criopreservação descrito é indicado para *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas (Pentatrichomonas) hominis*, *Trichomonas gallinae*, *Tritrichomonas foetus* e *Tritrichomonas suis*.

2. No Laboratório de Ultra-estrutura Celular Hertha Meyer, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), é usado o seguinte protocolo para a congelação e descongelação de *Trichomonas* spp.:

Meios e Reagentes

1. Meio de Diamond (*Trypticase-Yeast Extract-Maltose* [TYM])
2. Dimetilsulfóxido (DMSO)
3. Nitrogênio líquido (-196ºC)

Organismos

Culturas axênicas de tricomonas com 30 horas de crescimento.

Solução para Congelação a 10 % (v/v)

Dimetilsulfóxido (DMSO)	10ml
Soro (de cavalo ou bovino)	20ml
Meio de Diamond (TYM)	70ml

Congelação

1. Preparar e esterilizar, com antecedência, a solução para a congelação.

2. Centrifugar (2.000rpm/10min) a cultura axênica de 30 horas, para separar as células do meio de cultivo.

3. Ressuspender o sedimento de células no meio de congelação.

4. Transferir para criotubos (*Biofreeze™ Vials*, *Costar* cat. n.º 2027 ou 2028), 1 a 2ml da solução DMSO + TYM.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

5. Transferir imediatamente após para o *freezer* a -70ºC durante 24 horas.

6. Armazenar, por tempo indeterminado, os criotubos em botijão criobiológico (Taylor-Wharton-35 VHC) com nitrogênio líquido (-196ºC).

Observações

1. Após a centrifugação, proceder contagem das células em câmara de Thoma ou Neubauer. O ideal é congelar 1 a $2x10^7$ células/ml de meio.

2. Proceder com rapidez a partir da etapa 3, a fim de evitar o contato prolongado das células com o crioprotetor (DMSO), à temperatura ambiente, o que é bastante prejudicial para os organismos.

3. Durante a distribuição nos criotubos, deixar um espaço entre a tampa e o líquido (o preenchimento total da ampola pode acarretar ruptura dos criotubos, devido à expansão do material durante a solidificação).

4. No momento de transferir do *freezer* para o balão definitivo, fazê-lo em vasilhame (isopor), contendo pequena quantidade do criogênio (nitrogênio líquido), a fim de evitar choque térmico nas células; alguns pesquisadores na etapa 2, lavam as células com PBS estéril.

5. Todas as transferências devem ser realizadas em condições de assepsia total.

Descongelação

1. Retirar os criotubos do botijão criobiológico, com nitrogênio líquido, em banho de gelo e colocá-los em banho de água à temperatura de 37ºC.

2. Agitar (segurando com as mãos) até que ocorra a descongelação total do conteúdo do criotubo ou deixar a 37ºC somente o tempo necessário à descongelação.

3. Transferir o material descongelado para o meio de cultivo (TYM), em condições de assepsia total, deixando uma pequena alíquota para a observação ao microscópio óptico.

4. Incubar a 37ºC por aproximadamente cinco horas, após esse tempo proceder o repique normal.

Observações

1. Observar no microscópio óptico a viabilidade das células descongeladas.

2. Para os *Trichomonas*, o batimento dos flagelos já é um bom indício, sendo que células bem congeladas e descongeladas apresentam boa mobilidade e até mesmo certa rapidez característica. Para outros tipos de células existem outros indicadores, tais como corantes.

3. Alguns protocolos de congelação prescrevem a centrifugação imediata após o descongelação, com a finalidade de retirar do meio o crioprotetor (DMSO ou glicerol).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

4. Para os *Trichomonas*, protozoários bastante sensíveis à centrifugação, o procedimento cujo percentual de recuperação tem sido expressivo é o de diluir o crioprotetor, gradualmente com repiques sucessivos, uma vez que essa sensibilidade à centrifugação (células fragilizadas) encontra-se exacerbada devido à congelação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adler S, Pulvertaft RJV. The use of penicillin for obtaining bacteria-free cultures of *Trichomonas vaginalis* Donné, 1837. Ann Trop Med Parasitol 38:188-189, 1944.
2. Barreto MP, Zago Filho H. Comportamento de *Trichomonas vaginalis* Donné, 1837 e da *Trichomonas tenax* (Müller OF, 1773) em meio de cultura viscoso. Rev Brasil Biol 17:501-508,1957.
3. Borchradt KA, Smith RF. An evaluation and InPouchTV™ culture method for diagnosing *Trichomonas vaginalis* infection. Genitourin Med 67:140-152, 1991.
4. Diamond LJ. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. J Parasitol 43:488-490, 1957.
5. Diamond LS. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903, and E. histolytica-like amebae. J Parasitol 54:1047, 1968.
6. Diamond LS. Lumen dwelling protozoa: *Entamoeba*, trichomonads, and *Giardia*. In: Jensen JP, ed. In vitro Cultivation of Protozoan Parasites. Boca Raton (Fla): CRC Press, p. 65-109, 1983.
7. Diamond LS. *Entamoeba*, *Giardia* and *Trichomonas*. In Taylor ERA, Baker JR, eds. In vitro Methods for Parasite Cultivation. New York: Academic Press, p. 1-28, 1987.
8. Feinberg JG, Whittington MJ. A culture for *Trichomonas vaginalis* Donné and species of Candida. J Clin Path 10:327-329, 1957.
9. Hollander DH. Colonial morphology of *Trichomonas vaginalis* in agar. J Parasitol 62:826-828, 1976.
10. Honigberg BH. *Trichomonas* of importance in human medicine. In: Kreier JP, ed. Parasitic Protozoa. San Diego (Calif): Academic Press 276-454, v.2, 1978.
11. Jirovec O, Petrú M. 1968. *Trichomonas vaginalis* and trichomoniasis. Ad Parasitol 6:117-188, 1968.
12. Johnson G, Trussell RE. Experimental basis for the chemotherapy of *Trichomonas vaginalis* infections. I. Proc Soc Exp Biol Med 54:245-249, 1943.
13. Kulda J, Honigberg BM, Frost JK et al. Pathogenicity of *Trichomonas vaginalis*. Am J Obstet Gynecol 108:908-918, 1970.
14. Kupferberg AB, Johnson G, Sprince H. Nutrional requirements of *Trichomonas vaginalis*. Proc Soc Exp Biol Med 67:304-308, 1948.
15. Linstead D. Further studies on the cultivation of *Trichomonas vaginalis* in a defined medium. Parasitology 81:18-19, 1980.
16. Linstead D. New defined and semi-defined media for cultivation of the flagellate *Trichomonas vaginalis*. Parasitology 83:125-137, 1981.
17. Linstead D. Cultivation. In: Honigberg BM, ed. Trichomonads Parasitic in Humans. New York: Springer-Verlag, p. 91-111, 1989.
18. Lowe GH. A comparison of current laboratory methods with a new semi-solid culture medium for the detection of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Pathol; 18:432-434, 1965.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

19. Lowe GH. A comparison of culture media for the isolation of *Trichomonas vaginalis*. Med Lab Technol 29:389-391, 1972.

20. MacMillan A. Laboratory diagnostic methods and cryopreservation of trichomonads. In: Honigberg BH, ed. Trichomonads Parasitic in Humans. New York: Springer-Verlag, p. 297-310, 1990.

21. Trussell RE, Johnson G. *Trichomonas vaginalis* Donné. Recent experimental advances. Puerto Rico J Pub Hith Trop Med 20:289, 1945.

22. Visvesvara GS. Parasite Culture: *Trichomonas vaginalis*. In: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, p. 7.9.3.1-7.9.3.6. v.2, 1992.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CAPÍTULO 26



Trichomonas tenax e *Trichomonas hominis*

Geraldo Attilio De Carli
Tiana Tasca

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Trichomonas tenax: O *T. tenax* é um protozoário flagelado comensal, com ampla distribuição geográfica, que habita a cavidade bucal do homem. O trofozoíto é elipsóide, ovóide ou piriforme, medindo 4-16 x 2-15μm. A estrutura desse parasito é semelhante à do *Trichomonas vaginalis*, apresentando quatro flagelos anteriores. O *T. tenax* não sobrevive no estômago e não pode ser estabelecido na vagina. Não é conhecida a forma cística no seu ciclo biológico. A transmissão é direta através da saliva, existindo a possibilidade da transmissão indireta, uma vez que esse protozoário foi encontrado em crianças que nunca foram envolvidas em beijos sensuais. A transmissão também se dá através de escovas de dentes e de alimentos que foram previamente provados pelas mães. Apesar desse tricomonas ser considerado um comensal, autores da Europa Oriental relataram infecções respiratórias e abscessos torácicos atribuídos a ele. A prevalência varia de 0 a 25%, dependendo diretamente da higiene oral. O diagnóstico é realizado pela pesquisa do organismo no tártaro dos dentes, na goma de mascar ou nas criptas das amígdalas[7,8].

Trichomonas hominis: A espécie *T. hominis* é um protozoário flagelado, considerado não-patogênico, apesar de ser encontrado em fezes diarréicas. Apresenta ampla distribuição geográfica e parece apresentar maior prevalência nas regiões

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

tropicais e subtropicais do mundo. Como todos os tricomonadídeos, não tem a forma cística. Os trofozoítos habitam o intestino grosso (ceco e cólon) da espécie humana e se alimentam de bactérias. O organismo não é considerado invasivo. O corpo é piriforme, medindo 8-20 x 3-14μm. Essa espécie possui cinco flagelos anteriores, em um arranjo "4 + 1", mas alguns organismos podem apresentar quatro e outros, três flagelos. Os quatro flagelos anteriores estão agrupados entre si; o quinto está separado e direcionado para a extremidade posterior. O sexto flagelo ocorre ao longo da membrana ondulante, estendendo-se sobre ela como um flagelo livre. A membrana ondulante corre ao longo de toda a célula. Estão presentes nesse organismo o filamento acessório, a costa, o blefaroplasto e a pelta. O núcleo é arredondado. A multiplicação faz-se por divisão binária longitudinal. Nos espécimes frescos, principalmente nas fezes não-formadas, a motilidade do flagelado é visível. Os movimentos dos flagelos e da membrana ondulante e a presença do axóstilo são observados nas preparações a fresco, quando as amostras fecais são emulsificadas em solução salina isotônica (0,15M) tépida. Estes pequenos flagelados são dificilmente corados e podem ser omitidos nas colorações permanentes, especialmente nas colorações tênues[7,8].

TRICHOMONAS TENAX

A manutenção de cultura axênica de *T. tenax* apresenta mais dificuldades do que a do *T. vaginalis*. A primeira cultura axênica desse flagelado foi obtida por Diamond[2], usando um meio completo contendo TTY (*tryptose-trypticase-yeast*), caldo suplementado com soro de cavalo, extrato de embrião de galinha e antibióticos. Não existem relatos sobre o isolamento de *T. tenax*, em cultura axênica, diretamente do material coletado do hospedeiro ou de culturas polixênicas. Diamond[2,4,5] obteve cultura axênica empregando cultura monoxênica com *Trypanosoma cruzi*.

MEIO TTYS-CEEC$_{25}$ (*TRYPTOSE-TRYPTICASE-YEAST EXTRACT-SERUM-CHICK EMBRYO EXTRACT, CRUDE 25%*)

O meio TTYS-CEEC$_{25}$ (*Tryptose-Trypticase-Yeast Extract-Serum-Chick Embryo Extract, Crude* 25%) foi desenvolvido por Diamond em 1962[2]. O meio é indicado para isolamento e manutenção do *T. tenax*.

Reagentes

1. *Tryptose* (Difco)
2. *Trypticase* (BBL)
3. Extrato de levedo (Difco)
4. Glicose ($C_6H_{12}O_6$)
5. L-cisteína, cloridrato ($C_3H_7NO_2S.HCl$)
6. Ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$)
7. Cloreto de sódio (NaCl)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

8. Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)
9. Hidrogenofosfato dipotássico (K_2KPO_4)
10. Embrião de galinha

Meio Básico: *Tryptose-Trypticase-Yeast* (TTY)

Tryptose (Difco)	10g
Trypticase (BBL)	10g
Extrato de levedo (Difco)	10g
Glicose	5g
L-cisteína, cloridrato	1g
Ácido ascórbico	0,2g
Cloreto de sódio	5g
Hidrogenofosfato dipotássico	0,8g
Diidrogenofosfato de potássio	0,8g
Água destilada-deionizada	1.600ml

pH 7,0

Preparação

1. Dissolver os sais em 600ml de água-deionizada. Acrescentar e dissolver os ingredientes remanescentes na ordem apresentada sob agitação constante.

2. Ajustar o pH em 7,0 com solução de NaOH 1M. Completar o volume final em 1.600ml.

3. O meio é distribuído em frascos de *Erlenmeyer*, 160ml em cada frasco.

4. Adicionar 0,1g de Bacto ágar (Difco) por frasco. Autoclavar (121ºC/15min) e esfriar a 45ºC.

Extrato Cru de Embrião de Galinha a 25% (CEEC 25%)

Solução Salina Tamponada para Extrato de Embrião

Cloreto de sódio	5g
Hidrogenofosfato dipotássico	1,6g
Diidrogenofosfato de potássio	1,6g
Água destilada-deionisada q.s.p.	1.000ml

• Misturar os sais e autoclavar (121ºC/15min).

Preparação

1. Colher, assepticamente, embriões de galinha de 11-12 dias.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Remover os olhos e o bico. Pesar e colocar em um homogeneizador estéril.

3. Adicionar 2ml de solução salina tamponada fria, para cada grama de tecido (m/v) e agitar por dois minutos. Refrigerar por uma hora.

4. Remover o líquido abaixo da espuma e transferir para tubos de centrifugação com rosca (*screw-capped*).

5. Centrifugar (850 x *g*/20 min a 4ºC). Coletar o líquido sobrenadante, misturar os volumes e distribuir em tubos com rosca na razão de 10ml por tubo. Congelar, rapidamente, em banho de gelo seco e álcool.

6. Armazenar a -20°C.

Extrato de Vitaminas NCTC 107 Modificada

A mistura é composta por cinco soluções-estoque. Diamond[3] modificou a mistura original de Evans e cols.[6].

1. **Solução 1a** — Dissolver 62,5mg de niacina e 125mg de ácido p-aminobenzóico em água destilada-deionizada. Volume final: 150ml.

2. **Solução 1b** — Dissolver 62,5mg de niacinamida; 62,5mg de piridoxina; 62,5mg de cloreto de piridoxal; 25mg de cloreto de tiamina; 25mg de pantotenato de cálcio; 125mg de inositol e 1.250mg de cloreto de colina em água destilada-deionizada. Volume final: 150ml.

3. **Solução 1c** — Dissolver 25mg de riboflavina em 75ml de água destilada-deionizada. Volume final: 100ml.

4. **Misturar as soluções 1a, 1b, 1c** e completar o volume final a 500ml com água destilada-deionizada.

5. **Solução 2** — Dissolver 30mg de biotina (vitamina H) em 200ml de água destilada-deionizada. Adicionar NaOH 1M, gota a gota, para auxiliar a dissolução. Volume final: 300ml.

6. **Solução 3** — Dissolver 30mg de ácido fólico em 200ml de água destilada-deionizada. Adicionar NaOH 1M, gota a gota, para auxiliar a dissolução. Volume final: 300ml.

7. **Solução 4a** — Dissolver 300mg de vitamina D_2 (calciferol) em 63ml de etanol a 95% (v/v). Adicionar 300mg de vitamina A (retinol) e dissolver.

8. **Solução 4b** — Dissolver 60mg de vitamina K (menadiona hidrogenossulfito de sódio) em 300ml de solução aquosa de *Tween* 80 (a 5%, v/v). Misturar as soluções 4b e 4a, completando o volume final de 3.000ml com água destilada-deionizada.

9. **Solução 5** — Dissolver 25mg de vitamina E (acetato de α-tocoferol) em 25ml de água destilada-deionizada.

10. **Solução de trabalho** — Misturar as soluções: 1 (500ml), 2 (250ml), 3 (250ml), 4 (2.500ml) e 5 (250ml). Esterilizar por filtração (*Millipore*). Armazenar a -20°C. A solução deve ser clara antes e depois da congelação. A turvação da solução indica um excesso de NaOH durante a dissolução de algumas vitaminas; neste caso, descartar a mistura.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Meio Completo

1. Adicionar, assepticamente (em capela de segurança biológica de fluxo laminar vertical), a cada frasco com 160ml de caldo TTY e ágar liquefeito (45°C), 20ml de soro de cavalo ou bovino (inativado 56°C/30min), e 10ml da mistura de vitaminas NCTC 107. O meio é distribuído em tubos com rosca, 16 x 150mm (Pyrex n.º 9825), à razão de 9,5ml por tubo.

2. Armazenar a 45°C. Usar dentro de 10 dias. Imediatamente antes do uso, adicionar 0,5ml de $CEEC_{25}$ ao meio basal estabilizado à temperatura ambiente.

3. Antibióticos podem ser usados durante o estabelecimento de um novo isolamento: penicilina G potássica (1.000UI/ml) e sulfato de estreptomicina (1mg/ml).

TÉCNICA DE ISOLAMENTO

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. O parasito deverá crescer em cultura monoxênica com *Trypanosoma cruzi*, antes do estabelecimento no meio.

3. Para estabelecer uma cultura axênica, 2-4 x 10^5 tricomonas/ml com 72 horas de crescimento em cultura monoxênica, são inoculados em tubos contendo TTYS-$CEEC_{25}$ ou TP-S-1 (*Trypticase-Panmede-Liver Digest-Serum*) com 0,025% de Bacto ágar e suplementado com $CEEC_{25}$ (uma parte para 9,5 partes de TP-S-1).

4. As culturas são inoculadas a 35,5°C na posição vertical. Depois do estabelecimento das culturas, o extrato de embrião de galinha pode ser eliminado.

5. Os tripanossomos morrem antes da terceira transferência para um novo meio fresco. As primeiras 15 transferências são realizadas em intervalos de 48 a 72 horas e, subseqüentemente, em intervalos alternados de 72 e 96 horas.

6. Um inóculo grande é necessário nas primeiras quatro ou cinco subinoculações.

TRICHOMONAS HOMINIS

O *T. hominis*, devido à vasta flora bacteriana intestinal, pode apresentar dificuldades no estabelecimento direto em culturas axênicas. Esse flagelado medra no meio de Diamond[1], TYM, suplementado com soro de cavalo inativado (56ºC/30min) e em pH ajustado em 7,0. Emulsificar as amostras fecais cecais em 1 a 2ml de solução salina isotônica (0,15M) e inocular 0,5ml no meio apropriado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Diamond LS. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. J Parasitol 43:488-490, 1957.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Diamond LS. Axenic cultivations of *Trichomonas tenax*, the oral flagellate of man. I. Establishment of cultures. J Protozool 9:442-444, 1962.

3. Diamond LS. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and E. histolytica-like amebae. J Parasitol 54:1047, 1968.

4. Diamond LS. Lumen dwelling protozoa: *Entamoeba*, trichomonads, and *Giardia* In: Jensen JP, ed. In vitro Cultivation of Protozoan parasites. Boca Raton (Fla): CRC Press, p. 65-109, 1983.

5. Diamond LS. *Entamoeba*, *Giardia* and *Trichomonas*. In: Taylor ERA, Baker JR, eds. In vitro Methods for Parasite Cultivation. San Diego (Calif): Academic Press Inc., p. 1-28, 1987.

6. Evans VJ, Bryant JC, Fioramonti MC et al. Studies of nutrient media for tissue cells in vitro. I. A protein-free chemically defined medium for cultivation of strain L cells. Cancer Res 16:77, 1956.

7. Honigberg BH. Trichomonads of importance in human medicine. In: Kreier JP, ed. Parasitic Protozoa. San Diego (Calif): Academic Press Inc., p. 276-454, v.2, 1978.

8. Honigberg BM, Burgess DE. Trichomonads of importance in human medicine including *Dientamoeba fragilis*. In: Kreier JP, ed. Parasitic Protozoa. 2nd ed. San Diego (Calif): Academic Press Inc., p. 1-109, v.9, 1994.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Capítulo 27



Microsporídios

Marisa Porta Miche Hirschfeld
Maria Anete Lallo

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os microsporídios são protozoários classificados no Filo Microsporidia, conhecidos por infectar invertebrados e todas as classes de vertebrados. Por serem parasitos intracelulares obrigatórios, não podem crescer e se propagar independentemente da célula hospedeira[19]. Até o momento foram noticiados cerca de 100 gêneros e 1.000 espécies de microsporídios, sendo que somente alguns representantes foram isolados em cultura celular[33]. Embora estes protozoários sejam conhecidos desde 1857, o interesse pelos microsporídios, até o advento da SIDA/AIDS, era direcionado às espécies responsáveis por infecções em invertebrados e vertebrados de importância econômica, por exemplo: *Nosema apis*, *Nosema bombycis*, *Ameson michaelis*, *Glugia stephani*, *Nosema locustae*, *Vairimorpha necatrix*, *Encephalitozoon cuniculi*[7].

O cultivo *in vitro* desses parasitos intensificou-se nesses últimos anos, devido ao fato de que vários gêneros, por exemplo: *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Nosema*, *Vittaforma*, *Trachipleistophora* e *Pleistophora*, somente foram identificados nesta década como importantes patógenos oportunistas, especialmente nos pacientes com SIDA/AIDS[3,4,6,19,41]. O primeiro estudo sobre cultivo de microsporídios foi realizado em 1937 por Trager[34], que teve sucesso parcial em estabelecer o desenvolvimento *in vitro* de *Nosema bombycis* (parasito do bicho-da-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

seda), em culturas de células do tubo ovariano do bicho-da-seda[24]. Nos anos subseqüentes, vários microsporídios de importância econômica foram isolados e estabelecidos em cultura, quase sempre em linhagens celulares de insetos, embora alguns em linhagens celulares de mamíferos.

Até 1990, o *Encephalitozoon cuniculi* foi o único microsporídio parasito de mamíferos cultivados *in vitro*, por curto período de tempo ou em cultivos contínuos. Esta espécie foi cultivada pela primeira vez em células de plexo coróide de coelho (RCP — *rabbit choroid plexus cell*) por Shadduck em 1969[29] e a partir daí várias linhagens celulares têm sido utilizadas com esta finalidade.

Embora o primeiro caso humano de microsporidiose tenha sido relatado em 1959 por Matsubayashi e cols.[26], somente 21 anos depois é que foi isolado um microsporídio de origem humana em cultura celular.

Shadduck e cols., em 1990[30], relataram o isolamento da *Nosema corneum*, atualmente classificado como *Vittaforma corneae*[33], em uma amostra de biópsia da córnea de um indivíduo imunocompetente. A partir desta data, várias espécies de microsporídios de diferentes gêneros foram isoladas de fragmentos de tecido e de fluidos de seres humanos, tendo sido estabelecidas em cultura celular. Entretanto, algumas não conseguiram se propagar satisfatoriamente. É o caso do *Enterocytozoon bieneusi*, o qual apresentou desenvolvimento *in vitro* somente por um curto período de tempo, que variou entre seis semanas e seis meses[37].

Até 1996 não havia relatos sobre a possibilidade de outros hospedeiros serem infectados pelas mesmas espécies de microsporídios isoladas de seres humanos, com exceção do *E. cuniculi*. As espécies *E. bieneusi*, *Encephalitozoon hellem*, *E. intestinalis* foram identificadas em alguns animais domésticos, como porcos, burros, cachorros, vacas, cabras e também em pássaros[2,15]. Até o momento foram cultivados 79 microsporídios a partir de amostras biológicas de seres humanos, a saber: 13 foram da espécie *Encephalitozoon cuniculi*, provenientes de urina, escarro, ou lavado broncoalveolar; 32 foram da espécie *Encephalitozoon hellem*, provenientes de urina, escarro, lavado nasal, lavado broncoalveolar, ou biópsia de córnea; 22 foram da espécie *Encephalitozoon intestinalis*, anteriormente classificado como *Septata intestinalis*[17], provenientes de fezes, urina, lavado broncoalveolar, escarro, mucosa nasal, aspirado duodenal, ou amostras de biópsia de intestino; três foram da espécie *Encephalitozoon*-like, provenientes de urina, raspado de córnea e lesão hepática com cisto hidático, respectivamente; um foi da espécie *Vittaforma corneae* (anteriormente classificado como *Nosema corneum*), proveniente de mostra de biópsia de córnea; um foi da espécie *Trachipleistophora hominis*, proveniente de amostra de biópsia de músculo; um foi da espécie *Nosema* spp., proveniente de amostra de biópsia de córnea e seis foram da espécie *Enterocytozoon bieneusi*, proveniente de aspirado duodenal ou de amostra de biópsia duodenal[13,40].

A grande vantagem de se obter microsporídios a partir de culturas celulares *in vitro* é a ausência de bactérias e fungos como contaminantes, apresentando somente restos celulares, que podem ser facilmente removidos por lavagem e purificação dos esporos em gradiente de Percoll. Assim, um número relativamente grande de esporos purificados podem ser obtidos

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

a partir de cultura de células, permitindo a realização de vários estudos *in vitro* e *in vivo*[5,25,32]. O cultivo *in vitro* dos microsporídios, tal como o de qualquer outro parasito que causa doença em seres humanos, possibilita o estudo morfológico, bioquímico, fisiológico, molecular e nutricional destes agentes. Pode proporcionar condições para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico, permitindo o estudo destes protozoários por microscopia de luz e eletrônica, e o desenvolvimento de uma ampla variedade de técnicas imunológicas e biomoleculares, possibilitando a caracterização das espécies de microsporídios.

O desenvolvimento *in vitro* destes parasitos pode ser especialmente útil para a produção de antígenos, anticorpos monoclonais e policlonais, que poderão ser usados em provas imunológicas e para o desenvolvimento de vacinas. Ademais, podem promover ensaios com antibióticos e quimioterápicos, levando à descoberta de novas terapias, através da avaliação da eficácia antiparasitária, que, quando presente, permite a determinação *in vitro* das concentrações inibitórias mínimas e letais dos agentes testados. Também fornece condições para o estudo da sensibilidade e resistência dos isolados, frente a diferentes produtos terapêuticos. Em adição, permitem o desenvolvimento de modelos experimentais com diferentes animais, para que a doença seja reproduzida ou simulada, de modo que os processos fisiopatológicos e epidemiológicos da microsporidiose possam ser elucidados.

O isolamento de microsporídios em cultura sempre deve ser tentado, até mesmo quando um diagnóstico for presuntivo. Isto é particularmente importante para que seja estabelecido um banco de isolados e dados destes parasitos, com a finalidade de serem utilizados em estudos futuros.

CULTIVO DE MICROSPORÍDIOS EM CULTURAS CELULARES

Os microsporídios desenvolvem-se intracelularmente, não possuindo qualquer estágio metabólico ativo fora das células, portanto só podem ser cultivados em culturas celulares. Seu ciclo de vida envolve um estágio merogônico proliferativo, seguido por um estágio esporogônico, que resulta na formação dos esporos (Figs. 27.1 e 27.2). Estes apresentam uma estrutura polar espiralada denominada túbulo polar, que é responsável pela transferência do esporoplasma e do núcleo do parasito para a célula hospedeira, desta forma infectando-a[4,7,19,25,41].

Cultura de Células

Vários tipos de linhagens celulares em diferentes meios de cultura suplementados com soro foram empregados para o isolamento e manutenção *in vitro* de microsporídios de origem humana. As mais utilizadas para esse fim foram: células de rim de macaco (E6), fibroblastos de pulmão humano (HLF e MRC-5), células de rim de cão (MDCK), células de rim de coelho (RK 13); em meio essencial mínimo de EAGLE (MEM) ou RPMI 1640 suplementado com 5% a 10% de soro fetal bovino (SFB).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

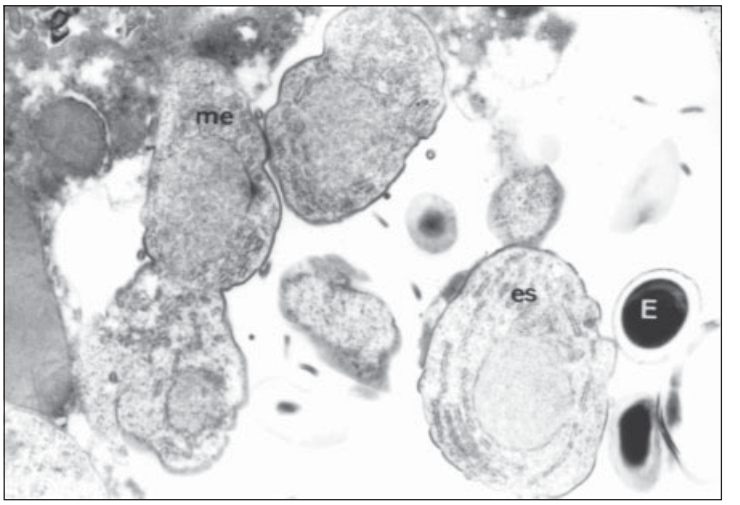


Fig. 27.1 — *Micrografia eletrônica mostrando meronte (me) em divisão, Esporontes (es) e Esporo maduro (E). Aumento 20.700X. (Cortesia de Marisa PM Hirschfeld e Maria A Lallo.)*

Processamento das Amostras Biológicas e Inoculação nas Culturas Celulares

Os microsporídios podem causar infecções localizadas e sistêmicas nos seres humanos, tendo sido isolados a partir de diferentes materiais biológicos. Conforme citado anteriormente, foram cultivadas espécies provenientes de: urina[1,8,20,22,27,38,39]; lavado broncoalveolar[14,27,28] e nasal[27]; aspirado duodenal[10]; escarro[9,28]; fezes[36]; líquor[14]; raspado conjuntival[13]; biópsia de córnea[11,30,31], de duodeno[37], de músculo[23], de sinonasal[12,21] e de lesão hepática com hidátide[16].

As amostras biológicas, antes de serem inoculadas nas culturas celulares, devem ser devidamente processadas. A seguir, estão relatados alguns procedimentos descritos na literatura. As amostras de urina, lavados e aspi-

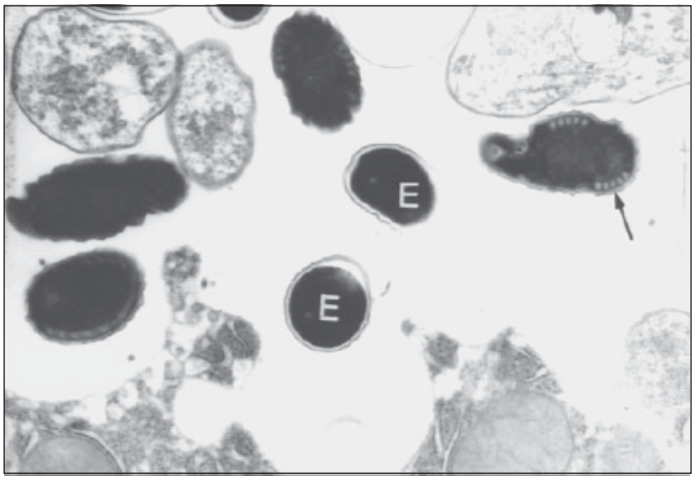


Fig. 27.2 — *Micrografia eletrônica mostrando esporos (E). A seta indica túbulo polar espiralado. Aumento 22.080X. (Cortesia de Marisa PM Hirschfeld e Maria A Lallo.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

rados foram concentradas por centrifugação a 1.500 x *g*/20min. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento foi lavado por duas vezes com água destilada, também por centrifugação. Em seguida, o sedimento foi inoculado em frascos de 25cm^3 contendo cultura de células E6, ou HLF, ambas em 10ml de meio MEM, suplementado com 10% de SFB, com 50µg de gentamicina/ml, 1.000µg de piperacilina/ml e de 10µg de anfotericina B/ml, sendo os frascos incubados à temperatura de 37°C[40].

As amostras de escarro foram tratadas com *Sputolysin*® e concentradas por centrifugação a 1.500 x *g*/20min. Em seguida, processadas conforme anteriormente descrito para urina, lavados e aspirados[9]. Um único método de isolamento destes parasitos a partir de fezes foi tentado por van Gool e cols.[36], em 1994, que resultou no isolamento de *E. intestinalis*. As amostras de fezes foram concentradas pelo método de centrifugação em sistema formol-éter. Os sedimentos contendo esporos foram ressuspendidos em uma mistura de antibióticos, contendo 100µg/ml de amoxicilina, vancomicina e gentamicina e 50µg/ml de flucitosina. A seguir, foram colocados em agitador e incubados a 37°C/18 horas. A mistura de fezes, esporos e antibióticos foi centrifugada a 1.550 x *g*/10min e o sedimento lavado por duas vezes com solução salina tamponada de fosfatos (PBS) com pH 7,2, também por centrifugação. Monocamadas de células RK-13 cultivadas em membranas *Transwell* (*Costar*: 24,5mm com poros de 0,4µm) e tratadas com colágeno foram colocadas em placas apropriadas, com seis cavidades, contendo MEM suplementado com 10% de FCS e 2,5µg de eritromicina/ml. O inóculo consistiu em 400µl da mistura de fezes tratada com antibióticos, o qual foi dispensado para cada membrana *Transwell*. As placas foram centrifugadas a 1.070 x *g*/30min em centrífuga apropriada (*microtiter plate*). O pH do meio foi ajustado para 7,0 a 8,0. Após centrifugação, as membranas *Transwell* foram lavadas delicadamente duas vezes com meio de cultura e as placas de cultura contendo as membranas foram incubadas por dois dias a 37°C em incubadora com CO_2. As membranas *Transwell* foram inoculadas novamente com a mistura de fezes-antibiótico, como anteriormente descrito. O meio nas placas abaixo das membranas *Transwell* foi substituído com meio novo, a cada dois dias.

Os raspados conjuntivais e os fragmentos de tecidos obtidos por biópsia foram triturados e posteriormente lavados com meio de cultura por centrifugação e em seguida inoculados nos frascos com cultura celular E6 ou HLF e incubados à temperatura de 37°C. O meio de cultura usado foi MEM, suplementado com 10% de SFB, 50µg de gentamicina/ml e 2µg de anfotericina B/ml (39). Alguns autores trataram previamente as amostras de tecido com solução de tripsina a 0,1%, sem colagenase, por 15 minutos à temperatura de 37ºC[23]. Outros autores ressuspenderam as amostras em solução salina tamponada de Tris contendo Tween 20 e centrifugaram a 400 x *g*/10min à temperatura ambiente. O sedimento foi lavado uma vez com solução salina tamponada de Tris e ressuspendido em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB, 2mM de L-glutamina, penicilina e estreptomicina, inoculado em seguida em cultura de células RK-13[12].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Metodologia das Culturas Celulares Inoculadas

As culturas celulares inoculadas com microsporídios devem ser examinadas freqüentemente em microscópio invertido, preferencialmente equipado com contraste de fase. Quando as células estiverem arredondadas e se desprendendo do tapete celular (Figs. 27.3 e 27.4), o meio de cultura e as células desprendidas devem ser decantados para um tubo de centrífuga e o meio novo acrescido de soro e antibióticos deve ser adicionado ao frasco com a cultura de células. O meio de cultura e as células desprendidas são centrifugados a 2.000 x *g*/30min e o sedimento lavado uma vez com 50ml de água destilada e reinoculado no mesmo frasco de origem. A partir daí, o meio de cultura deve ser trocado a cada 24 horas durante a primeira semana e a cada 72 horas nas semanas seguintes. O sobrenadante deve ser centrifugado a 2.000 x *g*/30min, e o sedimento, lavado e reinoculado no frasco de origem. Deste modo, os esporos presentes no meio de cultura, como também as células desprendidas contendo esporos e possivelmente microsporídios em diferentes fases de desenvolvimento, são concentrados antes de serem reinoculados no frasco de origem. Depois de duas a três semanas de tal manipulação, focos de células infectadas com o parasito deverão ser observados. Uma vez que aparecem os focos de infecção, não é mais necessário reinocular o sedimento com esporos no frasco de origem. Porém, em intervalos de sete dias, o meio de cultura no frasco deve ser trocado por meio novo. Entretanto, o meio, em vez de ser desprezado, deve ser centrifugado, com a finalidade de se concentrar os esporos, que deverão ser adequadamente armazenados para eventual utilização no futuro. Dois a três meses após o início do cultivo, aproximadamente 70% a 80% das células da monocamada deverão estar infectadas, estando com aspecto distendido devido à presença dos esporos. A cultura celular infectada, especialmente da linhagem E6, pode ser mantida deste modo por mais de 16 meses, pela simples substituição do meio antigo por meio novo. Quando grande quantidade

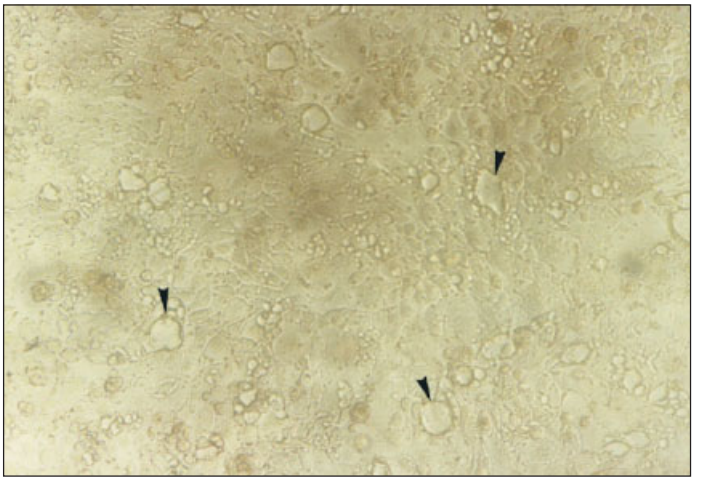


Fig. 27.3 — *Cultura de células MDCK inoculada com esporos de* Encephalitozoon cuniculi*. A seta indica os vacúolos. Objetiva 12,5X. (Cortesia de Marisa PM Hirschfeld e Maria A Lallo.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

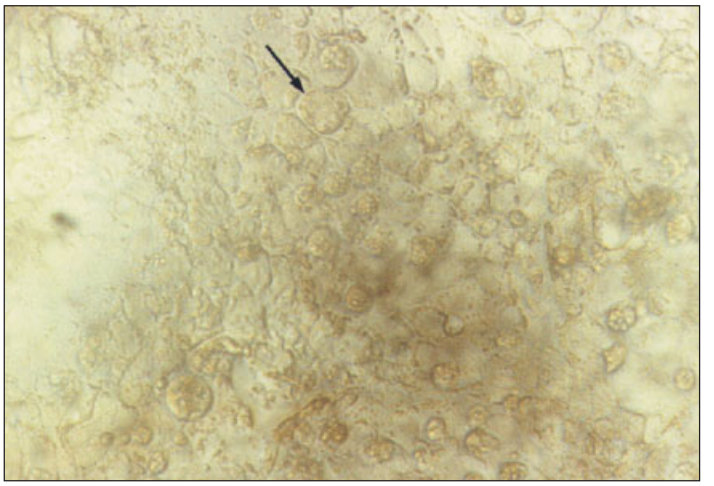


Fig. 27.4 — *Cultura de células MDCK inoculada com esporos de* Encephalitozoon cuniculi. *A seta indica as células arredondadas. Objetiva 25X. (Cortesia de Marisa PM Hirschfeld e Maria A Lallo.)*

de esporos for necessária para algum trabalho experimental, podem ser raspadas pequenas áreas da cultura celular infectada. O material raspado deve ser inoculado em novos frascos com cultura celular, para que se estabeleça a infecção e, assim, se expanda o número de frascos contendo monocamadas infectadas com uma determinada espécie de microsporídio.

A cultura de células infectadas também pode ser ampliada através de subcultivo rotineiro, porém com tratamento prévio das células com solução de tripsina. A cultura de células infectada é repartida em três partes e colocada em frascos com capacidade de 25cm^3, após tripsinização. Para a tripsinização, o meio é decantado e a cultura infectada deve ser lavada com aproximadamente 1ml de uma solução de tripsina em HBSS, contendo 0,05% de tripsina e 0,53mM de EDTA sem Ca^{2+} e Mg^{2+}. Aproximadamente 1ml da solução de tripsina é adicionado nos frascos, incubados por um a três minutos, apenas para cobrir a superfície das células. Os frascos são suavemente agitados para separar as células de suas paredes. A mistura de tripsina-células é várias vezes homogeneizada com pipeta e a seguir adicionada em 30ml de meio novo. Cerca de 10ml desta solução são distribuídos em frascos de 25cm^3. Dentro de três a quatro dias, serão estabelecidas monocamadas de culturas celulares infectadas nestes frascos[18,25,40].

CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ESPOROS

Para vários tipos de pesquisa experimental são necessários esporos em grande quantidade, que não podem estar contaminados com restos celulares e constituintes do meio de cultura. Para se obter uma preparação adequada, os esporos liberados no meio de cultura devem ser coletados por decantação, e colocados em tubos de centrífuga com capacidade de 50ml. Após centrifugação a 1.500 x *g*/20min, o sobrenadante é removido por sucção e o sedimento contendo os esporos é lavado uma vez com solução de dodecil fosfato de sódio em PBS. O sedimento é lavado novamente com PBS e

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

misturado com igual volume de Percoll, de modo a se obter uma concentração de Percoll a 50%. Depois, a mistura Percoll-esporos é centrifugada a 500 x *g*/30min à temperatura de 4°C. O sobrenadante é removido por sucção, e o sedimento é ressuspendido em solução de Hanks (HBSS) ou PBS e lavado por centrifugação como descrito anteriormente. Assim, o sedimento obtido deverá conter esporos livres de restos celulares e de constituintes do meio de cultura[39].

ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DAS AMOSTRAS

A cultura de microsporídios é um procedimento especializado, não sendo executado habitualmente nos laboratórios clínicos. Assim, amostras de pacientes com microsporídios devem ser enviadas aos laboratórios especializados, a fim de se proceder ao cultivo desses agentes. É necessário, portanto, o armazenamento das amostras adequadamente antes de serem transportadas. Os esporos, formas que iniciam a infecção na célula hospedeira e nas culturas celulares, são geralmente resistentes a muitos agentes físicos e químicos presentes no meio ambiente. Além disso, esporos de algumas espécies de microsporídios podem ser armazenados à temperatura de 4°C por períodos prolongados de tempo, sem que ocorra diminuição de sua infectividade em camundongos e em cultura de células de mamíferos[23,25,35]. Porém, é recomendado que as amostras sejam transportadas tão depressa quanto possível para um laboratório especializado, preferencialmente dentro de dois a três dias. É aconselhável, também, que as mesmas sejam mantidas à temperatura de refrigeração e transportadas em embalagens térmicas adequadas, de forma a minimizar possíveis contaminações e crescimento de bactérias e fungos.

CRIOPRESERVAÇÃO

As culturas de células infectadas com microsporídios podem ser armazenadas em temperatura de nitrogênio líquido. Sempre que uma espécie de microsporídio estiver bem estabelecida em cultura, é aconselhável que a mesma seja estocada em nitrogênio líquido. Tal recomendação é fundamentada, principalmente: na possibilidade de perda das culturas por eventual contaminação com bactérias ou fungos; na manutenção da antigenicidade, infectividade e virulência do microsporídio, visto que parasitos mantidos por longos períodos de tempo em cultura podem apresentar alterações destas propriedades[7,41]. Alguns princípios devem ser observados durante o processo de congelação, a fim de que os microsporídios preservem sua viabilidade para estudos ulteriores.

O meio de congelação deve ser composto do próprio meio de crescimento das células, contendo soro e um agente crioprotetor. Os mais utilizados são a glicerina ou o dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 5% a 15%. Assim, as células nas quais o microsporídio se desenvolveu, devem ser descoladas dos frascos de cultura por raspagem ou tratamento com tripsina e lavadas uma vez com meio de cultura sem soro. O sedimento contendo as células e os microsporídios é colocado em meio de cultura com 10% de soro

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

fetal bovino e misturado em partes iguais, com uma solução de meio de cultura contendo 20% de dimetilsulfóxido (DMSO). A mistura é armazenada em frascos de criopreservação em volumes de 1ml e submetida ao procedimento de congelação. A congelação deverá ser lenta para evitar a formação de cristais de gelo no interior das células. É recomendado que a velocidade de resfriamento seja de 1 a 3°C/minuto até -25°C e após atingir essa temperatura, a congelação poderá ser realizada mais rapidamente. Existem aparelhos apropriados para a obtenção da congelação lenta, mas, na prática, pode-se simplesmente congelar as células em congelador à temperatura de -70°C (no qual o resfriamento ocorre gradualmente) e depois transferi-las para o botijão criobiológico contendo nitrogênio líquido (-196°C). A descongelação deve ser rápida e realizada em banho de água à temperatura de 37-40°C, com agitação manual dos frascos criopreservados. Assim que a cultura degela e fica líquida, é transferida a um frasco de cultura com a linhagem celular apropriada, e incubada a 37°C. Dentro de uma semana, serão vistos focos de infecção nos frascos de cultura de células[25].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bocket L, Marquette CH, Dewilde A et al. Isolation and replication in human fibroblast cell (MRC-5) of a microsporidian from an AIDS patient. Microb Pathog 12:187-191, 1992.
2. Bornay-Llinares FJ, da Silva AJ, Moura H. Immunological, microscopic and molecular evidence of natural *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* infection in mammals other than humans. J Infect Dis 178:820-826, 1996.
3. Bryan RT. Microsporidiosis as an AIDS-related opportunists infection. Clin Infect Dis 21:S62-S65, 1995.
4. Cali A. General microsporidian features and recent findings on AIDS isolates. J Protozool 38:625-630, 1991.
5. Canning EU, Hollister WS. In vitro and in vivo investigations of human microsporidia. J Protozool 38:632-635, 1991.
6. Canning EU, Hollister WS. Human infections with microsporidia. Rev Med Microbiol 3:35-42, 1992.
7. Canning EU. Microsporidia. In: Kreier JP, Baker Jr. eds. In: Parasitic Protozoa. 2. Ed. New York: Academic Press Inc., p. 299-395, v.6, 1993.
8. Croppo GP, Vivesvara G, Leitch GJ et al. Western blot and immunofluorescence analysis of a human isolate of *Encephatitozoon cuniculi* established in culture from the urine of a patient with AIDS. J Parasitol 83:66-69, 1997.
9 De Groote MA, Vivesvara GS, Wilson ML et al. Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated *Encephalitozoon cuniculi* in patient with AIDS: successful therapy with albendazole. J Infect Dis 71:1375-1378, 1995.
10. Del Aguila C, Croppo GP, Moura H et al. Ultrastructure, immunofluorescence, Western blot, and PCR analysis of eight isolates of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* established in culture from sputum and urine samples and duodenal aspirates of five patients with AIDS. J Clin Microbiol 36:1201-1208, 1998.
11. Didier ES, Didier PJ, Friedberg DN. Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. J Infect Dis 163:617-621, 1991.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

12. Didier ES, Rogers LB, Orenstein JM. Characterization of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* isolates cultured from nasal mucosa and bronchoalveolar lavage fluids of two AIDS patients J Eukaryot Microbiol 43:34-43, 1996.

13. Didier ES, Snowden KF, Shadduck JA. Biology of Microsporidian species infecting mammals. Adv Parasitol 40:282-320, 1998.

14. Deplazes P, Mathis A, Baumgartner R et al. Immunologic and molecular characteristics of *Encephalitozoon*-like microsporidia isolated from humans and rabbits indicate that *Encephalitozoon cuniculi* is a zoonotic parasite. Clin Infect Dis 22:557-559, 1996.

15. Deplazes P, Mathis, A, Müller C et al. Molecular epidemiology of *Encephalitozoon cuniculi* and first detection of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal samples of pigs. J Eukaryot Microbiol 43:S.93, 1996.

16. Furuya K, Sato C, Nagano H. *Encephalitozoon*-like organisms in patient with alveolar hydatid disease: cell culture, ultrastructure, histoimmunochemical localization and seroprevalence. J Eukaryot Microbiol 42:518-525, 1995.

17. Hartskeerl RA, van Gool T Schuitema RJ. Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. Parasitology 110:277-285, 1995.

18. He Q, Leitch GJ, Visvesvara GS et al. Effects of nifedipine, metronidazole, and nitric oxide donors on spore germination and cell culture infection of the microsporidia *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon intestinalis*. Antimicrob Agents Chemother 40:179-185, 1996.

19. Hirschfeld MPM, Chieff PP, Dias LCS. Microsporídios. In: Cimerman B, Cimerman S, eds. Parasitologia Humana e seus fundamentos gerais. São Paulo: Atheneu; p.190-193, 1999.

20. Hollister WS, Canning EU, Colbourn NI. A species of *Encephalitozoon* isolated from an AIDS patient: criteria for species differentiation. Folia Parasitol 40:293-295, 1993.

21. Hollister WS, Canning EU, Colbourn NI et al. Characterization of *Encephalitozoon hellem* (Microspora) isolated from the nasal mucosa of a patient with AIDS. Parasitology 10:7351-358, 1993.

22. Hollister WS, Canning EU, Colbourn NI et al. *Encephalitozoon cuniculi* isolated from the urine of an AIDS patient, which differs from canine and murine isolates. J Eukaryot Microbiol 42:367-372, 1995.

23. Hollister WS, Canning EU, Weidner E et al. Development and ultrastructure of *Trachipleistophora hominis* n. g., n. sp. after in vitro isolation from an AIDS patient and inoculation into athymic mice. Parasitology 112:143-154, 1996.

24. Jaronski ST. Microsporidia in cell culture. In: Maramorosch K, ed. Advances in Cell Culture. New York: Academic Press, p.183-229. 1984. v.18.

25. Lallo MA. Estudo da Infecção experimental pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos BALB/C tratados com ciclofosfamida ou ciclosporina. São Paulo, 1998. 176p. [Tese de Doutorado — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo].

26. Matsubayashi H, Kolke T, Mikata I et al. A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. Arch Pathol 67:181-187, 1959.

27. Scaglia M, Sacchi L, Gatti L et al. Isolation and identification of *Encephalitozoon hellem* from an Italian AIDS patient with disseminated microsporidiosis. APMIS 102:817-827, 1994.

28. Schwartz DA, Visvesvara GS, Leitch GJ et al. Pathology of symptomatic microsporidial (*Encephalitozoon hellem*) bronchiolitis in the acquired immunodeficiency syndrome: a new respiratory pathogen diagnosed from lung biopsy, bronchoalveolar lavage, sputum, and tissue culture. Hum Pathol 24:937-943, 1993.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

29. Shadduck JA. *Nosema cuniculi*: in vitro isolation. Science 166:516-517, 1969.

30. Shadduck JA, Meccoli RA, Davis R et al. First isolation of a microsporidian from a human patient. J Infect. Dis 162:773-776, 1990.

31. Silveira H, Canning EU. In vitro cultivation of the human microsporidium *Vittaforma corneae*: development and effect of albendazole. Folia Parasitol 42;241-250, 1995.

32. Sodré FC. Microsporidioses humanas: desenvolvimento de métodos para o diagnóstico morfológico das microsporidioses intestinais em pacientes HIV-soropositivos no município do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1996. 118p. [Tese de Mestrado — Instituto Oswaldo Cruz — Fiocruz].

33. Sprague V, Becnel JJ. Note on the name-author-date combination for the taxon Microsporidies Balbiani, 1882, when ranked as a phylum. J Invertebr Pathol 71:91-94, 1998.

34. Trager C. The hatching of spores of *Nosema bombycis* Nägeli and the partial development of the organism in tissue cultures. J Parasitol 23:226-227, 1937.

35. Undeen AH. Growth of *Nosema algerae* in pig kidney cell cultures. J Protozool 22:107-110, 1975.

36. Van Gool T, Canning EU, Gilis H et al. *Septata intestinalis* frequently isolated from stool of AIDS patients with a new cultivation method. Parasitology 109:281-289, 1994.

37. Visvesvara GS, Leitch GJ, Gorelkin L et al. Short term *in vitro* culture of *Enterocytozoon bieneusi* from four different patients with AIDS. J Eukaryot Microbiol 42:506-510, 1995.

38. Visvesvara GS, Da Silva AJ, Croppo GP et al. *In vitro* culture and serologic and molecular identification of *Septata intestinalis* isolated from urine of a patient with AIDS. J Clin Microbiol 33:930-936, 1995.

39. Visvesvara GS, Leitch GJ, Da Silva AJ et al. Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-amplified small sub-unit rRNA identification of a microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. J Clin Microbiol 32:2760-2768, 1994.

40. Visvesvara GS, Moura H, Leitch GJ et al. Culture and propagation of Microsporidia. In: Murray W, Weiss LM, eds. The Microsporidia and Microsporidiosis. Washington (DC): ASM Press, p.363-391, 1999.

41. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA et al. Human microsporidial infections. Clin Microbiol Ver 7:426-461, 1994.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte



SEÇÃO 6

Imunodiagnóstico

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CAPÍTULO 28



Testes Sorológicos ou Imunoensaios

Ana Lígia Bender

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Durante muitos anos uma exaustiva pesquisa em imunoparasitologia foi dirigida para identificação, isolamento, purificação e caracterização dos antígenos dos parasitos. Os antígenos são necessários para o imunodiagnóstico, para a interpretação da imunopatologia, para a quantificação das diferentes respostas imunes do hospedeiro e para a avaliação do potencial das vacinas. Os anticorpos são utilizados para a padronização dos reagentes, no estudo da variabilidade antigênica, na imunização passiva e nos estudos da inibição *in vitro*. A sensibilidade, a especificidade e a reatividade devem ser consideradas na determinação do potencial específico dos testes; entretanto, todos esses fatores podem variar entre os laboratórios. Os seguintes testes são os que com maior freqüência são usados para o diagnóstico das doenças parasitárias.

REAÇÕES DE PRECIPITAÇÃO

As reações de precipitação são baseadas na quantificação de precipitados formados pela reação antígeno-anticorpo. Entre os vários fatores físico-químicos e imunológicos que interferem na quantidade do precipitado formado, os principais são as concentrações relativas de antígeno e anticorpo. As reações são reversíveis, onde pode haver dissolução do imunocomplexo for-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

mado, quando há excesso de um dos componentes. A precipitação máxima ocorre quando as quantidades de antígeno e anticorpo são equivalentes[3].

Imunodifusão Radial Dupla (IDRD)

Também conhecida como técnica de Ouchterlony. É o procedimento clássico usado para detectar a presença de anticorpos e determinar sua especificidade pela visualização de "linhas de identidade" (linhas de precipitado antígeno [Ag] anticorpo [Ac]). Estas linhas são formadas onde houver equivalência entre a concentração do Ag e do Ac. O soro do paciente é aplicado em um orifício no gel, que se difunde através dele e reage com um antígeno conhecido específico (ou anticorpo) que foi aplicado em um segundo orifício e também difundiu através do gel. A IDRD é estritamente qualitativa, contudo, a densidade da linha de precipitação e a distância da linha em relação ao orifício onde foi aplicada a amostra podem dar uma indicação da concentração de anticorpo[5].

Imunodifusão Radial Simples (IDRS)

É a variação quantitativa da técnica de Ouchterlony, em que o gel contém antígeno ou anticorpo distribuído e, em contrapartida, a amostra testada é aplicada no gel e se difunde através dele, resultando em uma linha de precipitação circular em torno do orifício de aplicação. O diâmetro do anel de precipitação é proporcional à concentração de anticorpo ou antígeno presente na amostra. Por comparação do diâmetro do anel de precipitação de um padrão conhecido, estima-se a concentração do anticorpo específico ou antígeno[5].

Imunoeletroforese (IEF)

Eletroforese é a migração de partículas carregadas em um solvente condutor sob a influência de um campo elétrico. As proteínas possuem cargas positivas e negativas e, assim, segundo o seu ponto isoelétrico e variação de pH, podem migrar para o pólo positivo, se a carga da superfície for negativa, ou para o pólo negativo, se a carga for positiva. Entre os fatores que governam a migração estão a carga, o tamanho e a forma das partículas, a concentração, a força iônica e o pH do solvente, a temperatura e a viscosidade do meio e o caráter e a intensidade do campo elétrico[1]. Imunoeletroforese é um procedimento em duas etapas que primeiro envolve a separação eletroforética das proteínas, seguida de imunodifusão de cada componente, a partir do seu centro de difusão, contra o anti-soro específico, formando uma linha ou arco de precipitação na região de equivalência. Assim, a caracterização de uma substância é feita a partir de suas propriedades eletroforéticas (mobilidades diferentes devido a cargas elétricas diferentes), coeficientes de difusão e propriedades imunológicas (especificidade). O sistema de imunodifusão que se obtém aproxima-se de uma dupla difusão bidimensional e, portanto, os padrões de precipitação obtidos podem ser interpretados como nas técnicas de dupla difusão[1].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Imunofixação (IFIX)

A imunofixação combina a eletroforese e a imunoprecipitação. É um procedimento em dois estágios: 1.º) a amostra é aplicada em seis posições diferentes do gel de agarose e as proteínas são separadas por eletroforese de acordo com a carga; 2.º) soros monoespecíficos para IgG, IgA, IgM, cadeia *Kappa* e cadeia *Lambda* impregnados numa fita de papel ou acetato de celulose são colocados individualmente sobre cada posição, seguidos da aplicação de solução fixadora de proteínas. Se o antígeno complementar estiver presente em proporções adequadas na amostra, os complexos formados precipitam e são fixados no gel, o que permite sua identificação com o auxílio de um corante. O teste é utilizado na detecção precoce de gamopatias monoclonais pequenas, no diagnóstico precoce e na intervenção terapêutica em casos novos e na recorrência de mieloma. Permite a identificação de gamopatias biclonais e o diagnóstico de doença de cadeias pesadas, auxiliando no diagnóstico e na monitorização de outras doenças linfoproliferativas[5].

Nefelometria (NEF)

Uma característica importante das soluções coloidais é sua pronunciada dispersão da luz. Quando um feixe de luz incidente atravessa um meio contendo partículas, estas interferem com a passagem da luz, fazendo com que seja dispersada em todas as direções. Este fenômeno, conhecido como efeito *Tyndall*, não altera o comprimento de onda da luz incidente e é independente do tipo de partícula. Princípio da nefelometria: a luz pode ser observada em todos os ângulos relacionados à direção do feixe de luz. As reações de precipitação entre antígeno e anticorpo em soluções diluídas produzem aumento da reflexão da luz, que pode ser diretamente medida pela dispersão da luz incidente. A quantidade e a natureza da dispersão dependem da forma e do tamanho das partículas, da concentração, do comprimento de onda da luz e do índice de refração do meio. A nefelometria é totalmente automatizada, de realização fácil, rápida e precisa, principalmente se forem utilizados nefelômetros que subtraiam ruídos, como os causados por lipemia, hemólise, e que garantam leitura na região de excesso de anticorpo. Medidas acuradas só podem ser feitas nesta região porque é onde existe relação linear entre concentração da substância e densidade óptica. Aplicação: determinações de proteínas específicas como alfa-1-glicoproteína ácida, alfa-1-antitripsina, alfa-2-antiplasmina, IgG, IgA, IgM, C3, C4, apolipoproteínas, beta-2-microglobulina etc.

Turbidimetria

Este teste está sujeito às mesmas condições dos sistemas nefelométricos. O sinal de detecção é a absorbância e não a intensidade de luz dispersa. Não necessita de aparelhagem especial. As reações podem ser medidas em espectrofotômetros utilizados em bioquímica. As utilizações são semelhantes à nefelometria.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

REAÇÕES DE AGLUTINAÇÃO

A reação de aglutinação caracteriza-se pela formação de agregados visíveis como resultado da interação de anticorpos específicos e partículas insolúveis que contenham determinantes antigênicos em sua superfície. A aglutinação específica faz parte de um processo dinâmico que ocorre em duas etapas. A primeira etapa começa logo após a mistura das partículas recobertas pelo antígeno com os anticorpos e consiste na ligação das moléculas do anticorpo aos antígenos de superfície, por meio de ligações não-covalentes, de acordo com a lei de ação das massas. A segunda etapa começa enquanto a primeira continua e resulta das colisões que ocorrem entre as partículas, de modo que os anticorpos ligados a uma partícula se ligam a determinantes antigênicos de outra: esses anticorpos estabelecem agregados que são visíveis a olho nu. Comparadas com as reações de precipitação, as técnicas de aglutinação, embora semiquantitativas, são mais sensíveis, necessitando de anticorpos 500 vezes menor, pois as partículas amplificam a reação[3]. Os fatores que interferem nas reações de aglutinação são: a) classe do anticorpo envolvido; b) eletrólitos; c) pH (entre 6 e 8); d) macromoléculas hidrofílicas (presença em baixas concentrações evita a auto-aglutinação); e) enzimas (evitam reações inespecíficas); f) tempo e g) temperatura[5].

Reação de Aglutinação Direta (AD)

Nesta reação utilizam-se partículas antigênicas insolúveis em sua forma íntegra ou fragmentada: hemácias, bactérias, fungos, protozoários podem ser aglutinados diretamente por anticorpo. No teste, são realizadas diluições em série do anticorpo, frente a uma quantidade constante do antígeno. Após um período de incubação, a aglutinação se completa e o resultado é geralmente expresso como a máxima diluição em que ocorre a aglutinação. Exemplo de reações de aglutinação direta: tipagem de grupos sangüíneos (antígenos específicos), reação de Paul-Bunnel-Davidson (antígenos heterófilos), teste de Widal para salmoneloses, teste de aglutinação para toxoplasmose e tripanossomíase[1].

Reação de Aglutinação Passiva ou Indireta

Nas reações de aglutinação passiva ou indireta, as hemácias e as partículas inertes (bentonita, látex, *sepharose*, leveduras etc.) podem ser sensibilizadas por adsorção passiva, devido ao contato direto com antígenos solúveis, por adsorção via agentes químicos solúveis, por adsorção via agentes químicos, como ácido tânico, cloreto de cromo e por conjugação do antígeno, por meio de ligações químicas covalentes, fornecendo reagentes estáveis. Devido à grande diversidade de antígenos que podem se ligar às células ou partículas, a aplicação dos testes de aglutinação passiva é muito variada[5].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Reação de Hemaglutinação (HA)

A reação de hemaglutinação é uma técnica para a detecção de anticorpos específicos que, quando presentes, reconhecerão antígenos presentes na superfície de eritrócitos, causando aglutinação. Pode-se realizar um teste semiquantitativo, com a diluição seriada da amostra do paciente, observando-se a maior diluição que ainda apresente aglutinação. Na reação de *hemaglutinação ativa (direta)* os determinantes antigênicos fazem parte da própria hemácia. Na reação de *hemaglutinação passiva (indireta)* as hemácias são suporte para antígenos que são adsorvidos à sua superfície, funcionando como um sistema indicador sensível na detecção de anticorpos. As hemácias suporte são preferentemente de carneiro ou humanas do grupo O, fixadas em formaldeído ou glutaraldeído, o que resolve o problema da fragilidade e da estocagem por longos períodos de tempo. A tamisação das hemácias altera sua superfície quanto às cargas, de modo a aumentar a quantidade de proteína adsorvida, tornando maior a sensibilidade do sistema. Empregando antígenos purificados, obtém-se maior sensibilidade e especificidade[1].

Reação de Inibição da Hemaglutinação (IHA)

A reação de inibição da hemaglutinação é uma variação da técnica de hemaglutinação. Alguns antígenos virais causam aglutinação espontânea de eritrócitos na ausência de anticorpos. Nestas situações, a reação antígeno-anticorpo específica impede a aglutinação dos eritrócitos. A reação de inibição da hemaglutinação não pode diferenciar isótipos de anticorpos específicos (IgG, IgA ou IgM); o tratamento de uma amostra positiva nesta reação com proteína A de *Staphylococcus aureus* para remover os anticorpos IgG pode ser usado para associar à presença de anticorpos IgM[3].

Teste de Aglutinação do Látex

Partículas de látex são esferas de poliestireno que podem ser utilizadas como suportes na adsorção de proteína solúvel e antígenos polissacarídicos, funcionando como sistema indicador da reação antígeno-anticorpo. O teste pode ser empregado na pesquisa de antígenos ou de anticorpos. A aplicação mais comum é na detecção de fator reumatóide, que é anticorpo da classe IgM pentamérico (também há fator reumatóide IgG e IgA) dirigido contra IgG (IgG1, IgG2, IgG4), IgA (IgA1), IgM e IgE.

Teste de Algutinação de Cristais de Colesterol

O teste do VDRL (*Veneral Disease Research Laboratory*) emprega cristais de colesterol que são sensibilizados com lecitina e cardiolipina para a pesquisa de anticorpos cardiolipídicos da sífilis[1].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Coaglutinação

É similar à técnica de aglutinação do látex para a detecção de antígeno. A proteína A, um componente de membrana distribuído uniformemente na parede celular do *Staphylococcus aureus*, é capaz de ligar a porção Fc (constante) de muitos isótipos de IgG, permanecendo a porção Fab livre para interagir com os antígenos presentes nas amostras. A aglutinação visível das partículas de *Staphylococcus aureus* indica a reação antígeno-anticorpo.

ENSAIOS LÍTICOS

Reação de Fixação do Complemento (RFC)

A ligação antígeno-anticorpo promove a fixação do complemento, cujo consumo, *in vitro*, pode ser empregado para detectar a presença de anticorpos, de antígenos ou de ambos. O teste é realizado em duas etapas: na primeira, o antígeno é incubado com o anticorpo, na fase fluida, na presença de uma quantidade definida de complemento. Se o antígeno e o anticorpo correspondentes estiverem presentes, a cascata do complemento será ativada pela via clássica e haverá consumo de complemento. Na segunda etapa, adiciona-se o sistema indicador da reação que consiste de hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina (anticorpo anti-hemácias de carneiro obtido em coelhos). A medida da atividade hemolítica do complemento no sistema indicador permite determinar a presença ou não de antígeno ou anticorpo na mistura inicial e sua quantidade. A atividade hemolítica pode ser quantificada empregando-se diluições seriadas da amostra a ser analisada. Tanto o anticorpo ou o antígeno não podem ter atividade anticomplementar, isto é, ativar o complemento separadamente. Durante algum tempo, a reação de fixação de complemento foi considerada muito importante devido a sua alta sensibilidade em relação ao demais testes disponíveis na época. Atualmente, embora existam testes mais sensíveis, ainda é utilizada na sorologia da doença de Chagas, da sífilis, de inúmeros vírus, rickéttsias e fungos. O teste é complexo e trabalhoso[1].

Ensaio de Neutralização

É semelhante à reação de fixação do complemento, mas é aplicável somente em certas situações patogênicas onde o anticorpo a ser medido é dirigido contra uma hemolisina (toxina bacteriana capaz de lisar diretamente os eritrócitos). Nestas situações, a hemolisina e os eritrócitos reagentes são adicionados e, se o anticorpo à hemolisina está presente, a lise dos eritrócitos não ocorrerá. A quantificação é realizada pela diluição seriada da amostra[3].

ENSAIOS COM MARCADORES FLUORESCENTES

Fluorocromo é uma substância que absorve luz de comprimento de onda menor e emite luz de comprimento de onda maior quando excitada, fenôme-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

no conhecido como fluorescência. A liberação de energia na fluorescência é imediata. Anticorpos marcados com fluorocromos têm sido usados desde 1941, quando Coons e cols. relataram o uso de anticorpos marcados com fluoresceína para localizar componentes do sistema imune em fluidos ou tecidos biológicos[3].

Testes Fluorescentes Homogêneos de Modulação Direta

Neste sistema o sinal emitido pelo antígeno marcado livre modifica, aumenta ou diminui, quando este se liga ao anticorpo. Por exemplo: *Fluorescence Polarization Immunoassay* (FPIA). Por este método o antígeno da amostra compete pelos sítios de ligação do anticorpo específico com o antígeno marcado com fluoresceína (*tracer)*. O *tracer* livre em solução rola ao acaso e tão rápido, que, quando excitado, emite luz menos polarizada. Quando o *tracer* se liga ao anticorpo específico, o rolamento se torna mais lento e a luz emitida, mais polarizada. Portanto, quanto menor a quantidade de antígeno na amostra, maior a quantidade de *tracer* ligado ao anticorpo específico em solução e maior a polarização. Principalmente moléculas pequenas podem ser mediadas por este ensaio. É amplamente utilizado para a monitorização de tratamento com drogas, por ser rápido e reprodutível[5].

Testes Fluorescentes Homogêneos de Modulação Indireta

A atividade de um modulador acoplado como o antígeno é modificada pela ligação do anticorpo, resultando em mudança de sinal. Por exemplo: *Substrate-Labelled Fluorescent Immunoassay* (SLFIA) tem dois reagentes básicos: um anticorpo específico para o antígeno e o antígeno ligado ao substrato fluorogênico betagalactosil umbeliferil fosfato. Baseia-se na inibição do anticorpo específico, pelo antígeno presente na amostra, deixando a enzima betagalactosidase livre para clivar o substrato, formando um produto fluorescente. O grau de fluorescência é proporcional à quantidade de antígeno da amostra. Se o anticorpo específico não for inibido pelo antígeno da amostra, reage com o antígeno ligado ao substrato e impede a clivagem do substrato. Permite detectar antígenos de alto e baixo peso molecular.

Testes Fluorescentes Homogêneos de Modulação Dupla

Baseados na marcação tanto do antígeno quanto do anticorpo com fluorocromos. Alteração de sinal ocorre na formação de complexo. Por exemplo: método de transferência de excitação.

Testes Fluorescentes Heterogêneos: Imunofluorescências Direta e Indireta

Imunofluorescência Direta (RIFD)

É a detecção direta de antígenos usando anticorpo antígeno-específico marcado com substância fluorescente. Pelo fato de ser utilizada para de-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

tectar antígenos em tecidos biológicos (material de biópsias, células etc.), ela é raramente quantitativa.

Imunofluorescência Indireta (RIFI)

É a detecção de anticorpos dirigidos contra alvo antigênico específico fixado em uma lâmina. Utiliza um anti-anticorpo marcado com substância fluorescente (conjugado). O conjugado é isótipo-específico, sendo, assim, possível distinguir IgG, IgA, IgM[3]. A imunofluorescência indireta é o teste de referência na sorologia de muitas doenças. Apresenta várias vantagens, pois é sensível, específica e reprodutível, de padronização e execução simples, o mesmo conjugado pode ser utilizado em sistemas diferentes. A necessidade de microscópio de fluorescência, a subjetividade na leitura e não-automação representam limitações do teste. O teste pode ser empregado para a detecção de anticorpos contra os seguintes parasitos: *Toxoplasma gondii, Trypanosoma cruzi, Plasmodium falciparum*, etc.[1].

Sistema Avidina-Biotina

O sistema avidina-biotina é uma técnica de amplificação. A avidina é uma glicoproteína derivada da albumina do ovo e possui alta afinidade pela biotina. A avidina pode ser saturada com moléculas de fluoresceína sem perder sua capacidade de ligação à biotina, fornecendo um conjugado cuja fluorescência específica é bem intensa[5].

ENSAIOS DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Imunoperoxidase (IP)

É um ensaio semelhante à imunofluorescência indireta em que a presença de anticorpo é identificada visualmente no substrato antigênico. Contudo, na imunoperoxidase indireta em vez do conjugado ser um anticorpo marcado com uma substância fluorescente, o conjugado é marcado com uma enzima (principalmente com a peroxidase), que reage com o seu substrato correspondente produzindo um produto que pode ser visto em um microscópio óptico, eliminando o custo do microscópio de imunofluorescência[3].

Imunocitoquímica (ICQ)

Envolve a avaliação microscópica computadorizada após um ensaio de imunofluorescência ou imuno-histoquímica em um material de biópsia de um paciente. Há um aumento na especificidade com a remoção da subjetividade do observador, podendo ser realizada a avaliação quantitativa através da análise de cor, intensidade e concentração.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

ENSAIOS COM MARCADORES RADIOATIVOS

RADIOIMUNOENSAIO (RIE)

Os testes com marcados radioativos utilizam um reagente marcado, antígeno ou anticorpo, para quantificar o antígeno ou o anticorpo não marcado da amostra. O termo radioimunoensaio (RIE) é utilizado usualmente quando o componente marcado é o antígeno e ensaio imunorradiométrico (IRMA) quando o componente marcado é o anticorpo. A medida é feita por contagem radioativa dependente do tipo de radiação emitida. Para radiações alfa e beta, utiliza-se um contador de cintilações e para radiações gama, um contador gama de cristal sólido. O radioisótopo mais utilizado é o iodo 125, porque tem meia-vida de 57,5 dias e o ensaio mais utilizado é o radioimunoensaio. A sensibilidade do método é da ordem de nanogramas ou picogramas[5].

RADIOALLERGOSORBENT TEST *(RAST)*

É o nome dado para o método *in vitro* que detecta a presença de anticorpos IgE (ou IgG) a alergenos, proteínas que podem provocar uma reação de hipersensibilidade observada em alérgicos. Uma matriz de carboidratos (chamada *sorbent*) é revestida com o alergeno. Os anticorpos alergeno-específicos da amostra ligam-se ao alergeno, podendo ser detectados utilizando-se um antianticorpo marcado com um radioisótopo.

ENSAIO DE QUIMIOLUMINESCÊNCIA (QL)

É baseado na emissão de luz produzida em algumas reações químicas de oxidação (aqui estão incluídas as substâncias bioluminescentes: agentes quimioluminescentes derivados biologicamente). A emissão de luz pode ser detectada ou medida, usando-se luminômetros com tubos fotomultiplicadores, diodo de silicone em estado sólido ou filme fotográfico como detector. As reações de quimioluminescência mais utilizadas envolvem reações de oxidação do luminol e do isoluminol, ésteres de acridina e decomposição catalisada pela fosfatase alcalina de adamantil 1,2-dioxetano aril fosfato. São altamente sensíveis e o nível de detecção é em atomol ou zeptomo[15].

ENSAIOS COM MARCADORES ENZIMÁTICOS

ENZIMAIMUNOENSAIO (EIE)

É o termo genérico para um grande número de testes que permitem um grande número de ensaios quantitativos para a detecção tanto de antígenos quanto de anticorpos. Estes testes usam o produto da mudança de cor da interação da enzima com o seu substrato (ou inibição) para medir a reação entre o antígeno e o anticorpo, p. ex.: EMIT, ELISA, MAC, MEIA.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Enzyme Multiplied Immunoassay Technique *(EMIT)*

É um teste de enzimaimunoensaio homogêneo (fase única) em que o antígeno a ser medido compete com um antígeno marcado com uma enzima, por um número limitado de anticorpos. O anticorpo reagente tem a capacidade de bloquear a atividade enzimática ao ligar-se ao antígeno marcado com a enzima, impedindo a formação do produto ao ser adicionado o substrato. O antígeno marcado livre resultante da competição com o antígeno da amostra reage com o substrato e forma um produto corado proporcional à concentração de antígeno presente na amostra[3].

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay *(ELISA)*

É uma técnica imunoenzimática sensível, heterogênea (múltiplas fases), para a quantificação de antígenos ou anticorpos, em que um dos reagentes é imobilizado na fase sólida, enquanto outro pode ser ligado a uma enzima, com preservação tanto da atividade enzimática como da imunológica do anticorpo[3]. A fase sólida pode ser constituída por partículas de agarose, poliacrilamida, dextrano, poliestireno etc. Placas plásticas são as mais difundidas por permitirem múltiplos ensaios e automação. O teste detecta quantidades extremamente pequenas de antígenos ou anticorpos, podendo ter elevada precisão se os reagentes e os parâmetros forem bem padronizados. Para a pesquisa de antígeno, o anticorpo específico correspondente é imobilizado à fase sólida. Para a pesquisa de anticorpos, o antígeno livre de impurezas é imobilizado à fase sólida. Os conjugados enzimáticos devem ser preparados com anticorpos de alta afinidade e muito purificados. Os substratos cromogênicos empregados pela degradação enzimática dão origem a produtos solúveis coloridos, cuja determinação é feita medindo-se a densidade óptica da solução espectrofotometricamente. Para a peroxidase, o substrato é o peróxido de hidrogênio e os cromógenos ou doadores de hidrogênio mais utilizados são a ortofenilenodiamina (OPD), ácido 5-amino-salicílico, ortotoluidina, 2,2'-diazino do ácido etilbenzotiazolino sulfônico (ABTS) e tetrametilbenzidina (TMB)[1].

ELISA Direto é uma técnica para a medida de antígeno baseada na competição entre o antígeno da amostra e o antígeno marcado com enzima pelo anticorpo.

ELISA Indireto ou ensaio imunométrico, mede a concentração de anticorpo usando o antígeno ligado à fase sólida, onde o anticorpo da amostra se ligará. O imunocomplexo será evidenciado pelo antianticorpo marcado com enzima (pode ser isótipo-específico: IgG, IgA, IgM, IgE) e a subseqüente adição do substrato/cromógeno. A especificidade do ensaio de ELISA indireto para a detecção de anticorpos da classe IgM em doenças infecciosas é limitada, ocorrendo resultados falso-positivos devido à interferência do fator reumatóide na presença de anticorpos IgG específicos[3].

ELISA com Captura de IgM (ELISA-IgM)

Foi desenvolvido para solucionar o problema anteriormente descrito da interferência do fator reumatóide na presença de anticorpos IgG específi-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

cos. Neste ensaio, anticorpos anti-IgM são adsorvidos à fase sólida, capazes de fixar todos os anticorpos de isótipo IgM da amostra do paciente. Após, o antígeno é adicionado, ligando-se ao anticorpo específico da amostra anteriormente imobilizado. Um segundo anticorpo antiantígeno marcado com enzima é adicionado e, subseqüentemente, o substrato/cromógeno, resultando em um produto corado de intensidade proporcional à concentração de IgM específica presente na amostra. Esta técnica é o método de escolha para a detecção de anticorpos IgM específicos[3].

Enzimaimunoensaio com Micropartículas (MEIA)

É uma técnica imunoenzimática em que o suporte sólido consiste de pequenas micropartículas em suspensão líquida.

TÉCNICAS DE IMUNOELETROTRANSFERÊNCIA

Western Blotting

É um procedimento no qual as proteínas são separadas pelo tamanho por eletroforese e, após a separação, transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde ficam imobilizadas. Essa membrana é utilizada como suporte sólido para um ensaio imunoenzimático *in situ*, conforme descrito em 1979 por Towbin e cols.[1,3], semelhante ao método da imunoperoxidase. Esta técnica pode ser empregada para a pesquisa de antígenos ou de anticorpos, sendo um importante auxiliar no diagnóstico de doenças infecciosas. Utilizando-se este teste, pode-se determinar se há antígeno ou anticorpo na amostra e qual é a sua especificidade, se o preparado é puro ou não, quais proteínas estão sendo reconhecidas por um anticorpo, distinguir diferentes perfis de anticorpos, de acordo com a fase da doença ou infecção, ou de acordo com a presença ou não de infecção, diferenciar entre cepas patogênicas e não-patogênicas[1].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferreira WA, Ávila SLM, eds. Sorologia: Importância e Parâmetros. In: Ferreira WA, Ávila SL, eds. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro (RJ), Guanabara Koogan, p.1-23, 1996.
2. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3nd ed. Washington (DC): ASM Press, 1997.
3. Peter JB. Use and Interpretation of Test in Infectious Disease. 4th ed. Santa Monica (Calif): Specialty Laboratories, p.361–367, 1996.
4. Reiche EMV, Morimoto HK, Inouye MMZ et al. Manual de Exames Imunológicos: Procedimentos técnicos e interpretação laboratorial. Londrina (PR): UEL, 1998.
5. Reis MM. Testes Imunológicos — Manual ilustrado para profissionais da saúde. Porto Alegre (RS): AGE, 1998.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CAPÍTULO 29



Diagnóstico Imunológico das Parasitoses

Adelaide José Vaz

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As parasitoses ainda representam importante causa de agravo à saúde em países em desenvolvimento, onde condições socioeconômico-culturais permitem a manutenção e disseminação de vários ciclos biológicos de parasitos.

É certo que medidas sanitárias, educacionais e de melhoria da condição social, por si só, conseguem minimizar e até eliminar a maioria das parasitoses que infectam o homem. Essa relação entre implementação na qualidade de vida e desaparecimento de infecções parasitárias foi nitidamente observada nos países da Europa Ocidental ao longo da primeira metade do século XX. Como essa não é a realidade de muitos países, a Parasitologia permanece como importante área de estudo, destacando-se o desenvolvimento de métodos diagnósticos que possam contribuir para: a) estabelecer adequadamente a etiologia da infecção para a correta intervenção terapêutica; b) avaliar a freqüência de determinadas parasitoses em diferentes áreas auxiliando no direcionamento de medidas de intervenção local e c) avaliar a eficiência de medidas profiláticas e terapêuticas ao longo do tempo[1-3].

IMUNOLOGIA DAS PARASITOSES

O conhecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na relação parasito-hospedeiro tem auxiliado na compreensão da

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

patogenia de muitas das parasitoses humanas. Por conseqüência, esse conhecimento tem auxiliado no desenvolvimento de testes imunológicos para o diagnóstico laboratorial.

Permanece, como expectativa futura, a possibilidade de desenvolvimento de vacinas que serão usadas para imunizar o hospedeiro, humano ou animal, que esteja vivendo em áreas de risco para essas infecções. As manifestações da resposta imune do hospedeiro são muitas vezes responsáveis pelas lesões teciduais que observamos nas infecções parasitárias, às vezes até mais graves do que aquelas provocadas pela presença e metabolismo parasitário. Por isso, muitas parasitoses são estudadas na Imunopatogenia, como, por exemplo, leishmaniose, doença de Chagas, cisticercose, hidatidose, toxocaríase, esquistossomose, entre outras.

Por outro lado, a resposta imune desenvolvida nem sempre é protetora, ou seja, o hospedeiro não consegue eliminar o parasito, nem fica imune a posteriores infecções. Esta situação, além de dificultar o desenvolvimento de vacinas, faz com que seja freqüente a cronicidade da infecção. Uma das complicações das infecções parasitárias ocorre quando o sistema imune do hospedeiro está deprimido, em que se observa uma disseminação do parasito causando quadros clínicos graves, como, por exemplo, na toxoplasmose e estrongiloidose. Essa complicação tem sido mais relatada após o aparecimento da infecção pelo HIV, especialmente nas áreas onde é mais numerosa a população de indivíduos infectados pelo vírus. Também se pode observar essa imunodeficiência em pacientes com neoplasias tratados com quimioterapia antiblástica e em pacientes transplantados submetidos a terapêutica imunossupressora[1-3].

FENÔMENOS IMUNOLÓGICOS

Além da resposta de defesa (imune-inflamatória), com o objetivo de eliminar o parasito, outros mecanismos imunológicos são relatados na infecção parasitária:

1. Formação de imunocomplexos (hipersensibilidade tipo III): ocorre quando se formam macroimunocomplexos por excesso de antígenos (parasito) e anticorpos (hospedeiro) que se depositam em endotélio de vasos e membrana basal dos glomérulos. Com a fixação de complemento nesses tecidos, que possuem receptores para os fatores C3b e C5b (produtos da fixação de complemento), serão observadas lesões graves (arterites e glomerulonefrites). Exemplo: malária.

2. Reação do tipo anafilática: ocorre em infecção parasitária com produção de anticorpos da classe IgE. Essa imunoglobulina fixa-se à membrana de mastócitos e quando se liga a antígenos parasitários desencadeia a degranulação da célula com liberação de aminas vasoativas, como a histamina, que podem levar, na forma mais grave, ao choque anafilático. Exemplo: hidatidose e toxocaríase.

3. Mecanismos auto-imunes: têm sido relatados em infecções crônicas com diferentes etiologias. Dentre as parasitoses temos como exemplo a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, em que o parasito intracelular e a res-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

posta imunológica do tipo citotóxica com inflamação crônica podem levar ao aparecimento de anticorpos contra os antígenos da célula infectada (auto-anticorpos). O papel dessa resposta auto-reativa na patogenia da doença de Chagas ainda não está bem estabelecido[1-3].

MODELOS DE ESTUDO

A complexidade dos ciclos biológicos dos parasitos tem sido utilizada para estudar a também complexa resposta imune dos hospedeiros. Por exemplo: formação e regulação da inflamação com granulomas (ovos de *Schistosoma*), produção e papel das citocinas na resposta imune celular e humoral (leishmaniose visceral). Modelos experimentais de infecção por parasitos também são úteis para a manutenção de cepas parasitárias e para a obtenção de antígenos em larga escala e de maneira homogênea, já que o isolamento e a obtenção de parasitos a partir do ciclo biológico natural são quase sempre difíceis e de pouca praticidade.

DIAGNÓSTICO DAS PARASITOSES

O estabelecimento da etiologia de uma infecção é quase sempre complexo. Consiste numa série de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Hoje também contamos com recursos de imagem, como ultra-sonografia, tomografia e ressonância magnética, ainda que nem sempre estejam disponíveis para a maior parte da população.

Em muitas parasitoses, não há sintomatologia ou as manifestações clínicas são brandas ou inespecíficas, o que dificulta o diagnóstico etiológico. Outras são crônicas de longa evolução, o que dificulta o levantamento de dados epidemiológicos que ajudem a definir a forma de contágio ou infecção. O diagnóstico laboratorial surge como uma ferramenta auxiliar de grande utilidade no diagnóstico das parasitoses. Podemos dividi-los em métodos diretos e indiretos. Consideramos como métodos diretos, aqueles em que é possível identificar diretamente a presença do parasito ou seus produtos. E como indiretos, aqueles métodos que detectam a resposta imunológica do hospedeiro[1-3].

Métodos Diretos

Não é objetivo deste capítulo a apresentação de métodos diretos de detecção de parasitos, geralmente em fezes ou material biológico supostamente infectado, que podem ser vistos com detalhes nos respectivos capítulos deste livro.

Resumidamente, esses métodos incluem: a) exames a fresco para pesquisa de trofozoítos nas fezes; b) métodos de colorações que apresentam maior especificidade para identificação de estruturas parasitárias (morfologia) e melhor sensibilidade; c) métodos de concentração que aumentam a sensibilidade e consistem em centrifugação em variadas soluções, preparo em soluções de diferentes densidades ou temperaturas e sedimentação es-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

pontânea; d) isolamento e cultura para alguns protozoários, em meios de cultura, culturas de células e inoculação em animais de laboratório; e) detecção de material genético (DNA, RNA) parasitário; f) detecção de antígenos circulantes em fluidos; e g) imunohistoquímica ou detecção de antígenos *in situ*. A aplicação da Biologia Molecular é ainda uma expectativa futura para o estudo de parasitoses, mas certamente de grande valor pela elevada sensibilidade e alta especificidade[1-3].

Biologia Molecular Aplicada às Infecções Parasitárias

Também não é objetivo deste capítulo a metodologia de Biologia Molecular que vem sendo cada vez mais aprimorada. É fato que a próxima década deve transformar a prática do laboratório clínico e as técnicas moleculares farão parte dessa realidade. Hoje, vírus podem ser facilmente estudados em análises clínicas, na detecção, quantificação (carga viral) e genotipagem para identificar tipos e subtipos, bem como identificar genótipos resistentes a determinados fármacos.

Os parasitos são mais complexos e ainda há pouco conhecimento a respeito de todo o genoma desses organismos, especialmente os helmintos. Parte do genoma de alguns parasitos tem sido identificada por tecnologia de DNA recombinante usando anticorpos para identificar antígenos expressos em clones recombinantes. As sondas de DNA parasitário marcadas também podem ser usadas em técnicas de hibridização para detecção de genoma parasitário em cortes histológicos.

Uma característica das técnicas de Biologia Molecular, fascinante para aplicação em testes imunológicos, é sua absoluta especificidade, que permite distinguir cepas parasitárias, o que nem sempre é possível pela identificação dos antígenos expressos.

De fato, a Biologia Molecular é uma das ferramentas mais promissoras para a obtenção de antígenos recombinantes. E como veremos, a obtenção de antígenos parasitários para uso nos testes imunológicos é ainda problemática[71-85]. Ver Capítulo 30 — Métodos Moleculares no Diagnóstico das Parasitoses Humanas.

Métodos Indiretos

Em algumas infecções parasitárias, o diagnóstico direto é dificultado, como, por exemplo, toxoplasmose, doença de Chagas (fase crônica), abscesso amebiano, leishmaniose visceral, esquistossomose (fase crônica), larva *migrans* visceral (toxocaríase), cisticercose e hidatidose.

Nesses casos, o diagnóstico imunológico indireto de detecção de anticorpos produzidos pelo hospedeiro são de grande importância. A especificidade da resposta imunológica, portanto dos anticorpos produzidos, é a característica que confere elevado valor preditivo aos testes imunológicos. Outra característica importante na padronização dos testes imunológicos é a estabilidade dos imunocomplexos formados, já que será a detecção desses imu-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

nocomplexos que permitirá identificar a presença de anticorpos na amostra obtida. No entanto, duas outras características aparecem dificultando a adequada padronização dos testes imunológicos. A principal é a chamada memória imunológica, ou seja, são detectados anticorpos em pacientes com a doença, naqueles que já estão curados da infecção, bem como naqueles que tiveram contato com o parasito mas não foram infectados e nos vacinados. A outra característica adversa na padronização de testes imunológicos diz respeito à freqüente semelhança entre os antígenos constituintes dos parasitos. Por exemplo, o conteúdo antigênico do tegumento da maioria dos helmintos é semelhante; antígenos de excreção-secreção (metabólitos) são semelhantes em parasitos da mesma família. Essa semelhança antigênica se mostra como reatividade cruzada nos testes imunológicos. A reatividade cruzada é mais freqüente quando os anticorpos são de baixa afinidade, o que acontece no início da infecção[1-3].

REAÇÃO CRUZADA E REAÇÃO INESPECÍFICA

Cabe diferenciar reação cruzada — os anticorpos detectados foram produzidos para antígenos semelhantes ou idênticos de parasitos distintos — de reação inespecífica, que pode ocorrer em amostras de indivíduos sadios.

Os anticorpos inespecíficos são chamados de anticorpos naturais e são considerados na padronização dos testes imunológicos através da utilização de amostras-controle obtidas de indivíduos supostamente sadios. Os resultados desse controle são utilizados para definir o limiar de reatividade (*cut-off*), ou seja, o valor de leitura a partir do qual se considera o resultado do teste como positivo ou significativo. Por esse motivo, quando da introdução de testes padronizados em outras áreas ou países, muitas vezes se faz necessária a validação do teste com amostras dessa nova população de estudo[1-3].

ANTÍGENOS

Antígeno (Ag): é o termo utilizado para descrever qualquer molécula capaz de ser reconhecida pelo sistema imunológico e induzir uma resposta específica contra seus constituintes moleculares. *Imunogenicidade:* capacidade do antígeno estimular o sistema imunológico. De maneira geral, quanto maior a complexidade molecular e conformacional, maior a imunogenicidade. Assim, proteínas são bons imunógenos e lipídeos, devido à estrutura repetitiva, são maus imunógenos. Resíduos de açúcares e de ácidos nucléicos são bons imunógenos quando associados a proteínas. Moléculas inorgânicas não são imunógenos, a menos que estejam ligadas a proteínas. *Antigenicidade:* característica do antígeno ser reconhecido pelos produtos da resposta imunológica, anticorpos e receptores de antígeno dos linfócitos T. *Epítopo ou Determinante Antigênico:* é a menor porção da molécula de antígeno responsável pela interação com o sítio combinatório do anticorpo. Nos testes imunológicos, uma das dificuldades é a utilização de antígenos que permaneçam com sua estrutura molecular reconhecida pelos anticorpos que estamos tentando detectar. Qualquer modificação na conformação espacial do

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

antígeno utilizado *in vitro* pode significar que não é mais antigênico, ou seja, não servirá para detectar anticorpos produzidos pelo estímulo do mesmo antígeno *in vivo*.

Outra fonte de antígeno para uso nos testes imunológicos é aquela obtida pela tecnologia de DNA recombinante, ainda pouco disponível para o estudo de parasitos. Também nos testes para detecção de antígenos é necessário produzir e purificar anticorpos (policlonais ou monoclonais). A produção prévia desses anticorpos implica o uso de antígenos para imunizar animais. Geralmente são usados extratos antigênicos que facilmente são reconhecidos pelos anticorpos obtidos. Mas quando utilizamos esses mesmos anticorpos para detectar antígenos na infecção natural, poderemos não ter sucesso. Uma das razões é que os antígenos na infecção são modificados por processos imunoinflamatórios ou pelo metabolismo parasitário e, portanto, esses antígenos são estruturalmente diferentes dos antígenos que utilizamos para obtenção dos anticorpos[1-3].

IMUNOGLOBULINAS/ANTICORPOS

Imunoglobulinas são proteínas séricas presentes nas frações beta-2 e gamaglobulina. Possuem a função de anticorpo (Ac) e outras funções biológicas que permitem classificá-las de acordo com características imunoquímicas. A característica de interação específica com o antígeno é tão importante que, muitas vezes, o termo anticorpo é utilizado no lugar de imunoglobulina (Ig).

A estrutura básica ou monômero de Ig é constituída de duas cadeias pesadas [H (*heavy*)] idênticas, cada uma com cerca de 200-250 aminoácidos, e duas cadeias leves [L (*light*)] também idênticas, com cerca de 100-120 aminoácidos. As cadeias H são unidas entre si por pontes dissulfeto, e as cadeias L são unidas às cadeias H, também por ligação S-S. A porção aminoterminal de cada cadeia H e L forma o sítio combinatório do anticorpo (local de interação com o antígeno). Desse modo, cada molécula de Ig possui dois sítios combinatórios, sendo, portanto, bivalente quanto à função de anticorpo. Essa fração é chamada de Fab (*antigen-binding*), é formada pela interação de cerca de 100 aminoácidos e é bastante variável, o que explica a grande diversidade de sítios combinatórios (cerca de 10^{12} a 10^{20} possibilidades).

A porção carboxiterminal das duas cadeias H forma a fração Fc, mais constante, com variações que determinam as classes de Ig, com funções biológicas variadas.

IgG: é a principal Ig, constituindo o anticorpo da resposta secundária (imunidade), possui quatro subclasses e atravessa a placenta. No recém-nascido, os anticorpos presentes são IgG materna, exceto se tiver havido infecção intra-uterina, quando o bebê pode apresentar Ig produzidas por ele, dentre as quais a IgM. A IgG fixa complemento e várias células fagocíticas possuem receptores para Fc de IgG, que é chamado também de opsonina (facilitador da fagocitose).

IgM: é um pentâmero da estrutura básica, sendo o primeiro anticorpo formado quando de primeiro estímulo antigênico e por isso chamado de

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

marcador de infecção aguda/recente. É um excelente anticorpo fixador de complemento. Como possui 10 sítios combinatórios, é detectado mais facilmente pelos testes imunológicos iniciais, aglutinação e precipitação, proporcionando boa sensibilidade desses testes na fase inicial das infecções. Existe também a IgM monomérica ancorada à superfície do linfócito B, onde funciona como receptor de antígeno.

IgA: o monômero é encontrado circulante. Na forma dimérica e com a Fc protegida pelo componente S (secretor) é encontrada nas secreções e saliva, onde representa a principal Ig, justamente por ser mais resistente à degradação enzimática nesses locais. No ser humano é encontrada em elevadas concentrações no colostro e leite materno, com importante papel de defesa para o bebê.

IgE: tem como característica a baixa concentração sérica e cerca de 100 aminoácidos adicionais na porção Fc, formando o quinto domínio da cadeia H, com elevada afinidade para o receptor FceR de mastócitos e basófilos, células que contêm mediadores autacóides, como histamina e serotonina. Por essa razão é chamada Ig anafilática. Curiosamente, está envolvida na resposta imune a helmintos, embora, devido a menor concentração em relação à IgG, seja difícil sua detecção em testes imunológicos IgE específicos.

IgD: é expressa em linfócitos B juntamente com a IgM de superfície. Está presente apenas no linfócito B em diferenciação após ativação antígeno-específica, mas não em plasmócitos secretores de anticorpos[1-3].

TESTES IMUNOLÓGICOS

$$Ag + Ac \Leftrightarrow Ag\text{-}Ac \text{ (imunocomplexo)}$$

Essa interação segue o modelo biológico do tipo enzima-substrato, um perfeito encaixe espacial entre as duas moléculas, lembrando a idéia de chave-fechadura. Tem como características: a) *reversibilidade:* a interação entre os epítopos antigênicos e o sítio combinatório do anticorpo é do tipo não-covalente e depende de interações do tipo ponte de hidrogênio e hidrofobicidade; b) *especificidade:* em razão das características da resposta imune, para cada epítopo antigênico são obtidos anticorpos com sítio combinatório perfeitamente específico para essa conformação; e c) *constante de afinidade:* é uma medida da força de ligação molecular entre o antígeno e o anticorpo, definindo a estabilidade do imunocomplexo. Como a resposta imune é policlonal, com múltiplos complexos Ag-Ac, o soro imune possui a somatória dessas afinidades, chamada de avidez do soro, índice importante, principalmente na produção de soros hiperimunes[1-3].

PRINCÍPIO DE ALGUNS TESTES IMUNOLÓGICOS

Precipitação

Foram os primeiros métodos utilizados na detecção do complexo Ag-Ac. No entanto, eram de baixa sensibilidade, já que para a visualização do

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

macrocomplexo era necessário enorme quantidade de moléculas de Ag e de Ac. Para a obtenção de precipitados visíveis é preciso que o antígeno contenha múltiplos determinantes e que ocorram interações cruzadas entre moléculas diferentes de Ac e esses determinantes, formando uma rede complexa e de elevado peso molecular.

Portanto, a formação de precipitados implica a existência de proporções adequadas de Ag e de Ac. De acordo com a Teoria das Malhas, somente na zona de equivalência essa proporção seria adequada para a obtenção de precipitados visíveis. Na região chamada pró-zona há excesso de Ac que não conseguem fazer o máximo de ligações entre seus dois sítios combinatórios e epítopos localizados em moléculas diferentes de Ag. Por outro lado, se houver excesso de Ag, ou falta de Ac, não haverá número suficiente dessas interações e também não se formará o precipitado visível. Para sanar o primeiro problema, que também ocorre nos métodos de aglutinação, as técnicas de precipitação são empregadas com diluições sucessivas do soro contendo os Ac. A quantidade insuficiente de Ac determina a baixa sensibilidade do método. No sentido de facilitar a visualização do complexo imune foram desenvolvidas técnicas em meios semisólidos, onde um dos componentes está fixo e o outro migra em sua direção. Quando atingem a proporção ideal, zona de equivalência, o precipitado se constitui na forma de halos. Outra possibilidade é a migração concomitante dos dois componentes (dupla difusão), formando-se linhas ou bandas de precipitação. Nessas variações técnicas, o coeficiente de difusão das moléculas, de Ag ou de Ac, é fator importante para a eficiência da técnica. De qualquer forma, essa difusão requer um período longo de horas, outra desvantagem do método. Posteriormente, aplicando-se corrente elétrica, corrida eletroforética, pode-se abreviar o tempo de difusão e minimizar o efeito da lentidão da difusibilidade de moléculas de elevado peso molecular, melhorando o desempenho do método de precipitação. Nesse caso, como a eletroforese separa os subcomponentes de Ag e de Ac conforme a carga elétrica, pode-se definir melhor a composição dessas moléculas. Apesar de conservarem ainda menor sensibilidade que os métodos atuais, as técnicas de imunoeletroforese são até hoje empregadas na padronização preliminar de extratos antigênicos e soros hiperimunes.

Mais recentemente, por técnicas de automação, pode-se aumentar muito a sensibilidade da metodologia de precipitação. Isto porque, antes de se formarem macroprecipitados, forma-se uma turvação, com menor número de moléculas de Ag e de Ac, mas que não pode ser visualizada e mensurada pelo olho humano. Espectrofotômetros podem mensurar essa turvação pelo desvio de luz que ela causa. São as técnicas de turbidimetria e nefelometria, que se utilizam de reagentes chamados aceleradores, micropartículas sensibilizadas com o Ag ou o Ac. A desvantagem dessas técnicas é que amostras lipêmicas ou contaminações bacterianas podem interferir com os resultados. Como podem ser feitas calibrações a partir de padrões de concentração conhecida, as técnicas de turbidimetria e nefelometria são quantitativas e têm larga aplicação na dosagem de componentes séricos. Não são utilizadas para a detecção de anticorpos em infecções, pois ainda são de baixa sensibilidade para essa finalidade[1].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Aglutinação

O princípio das técnicas de aglutinação é o mesmo das de precipitação, mas o componente conhecido, Ag ou Ac, está ligado à superfície de partículas/células, o que facilita em muito a visualização do complexo Ag-Ac na forma de agregados. Outra vantagem é a rapidez com que se obtêm os resultados, de minutos a horas. Em relação à precipitação, a aglutinação perde o poder de discriminar frações dos componentes; por outro lado, quando o antígeno é fixado às partículas/células pode ser purificado e ainda assim conservar suas características de complexidade. Quando as células são hemácias, a técnica é chamada de hemaglutinação, normalmente realizada em placas de microtitulação. Outro suporte muito utilizado consiste de micropartículas de látex (poliestireno), homogêneas quanto ao tamanho, com a vantagem de permitir a realização de testes rápidos de aglutinação. Com relação ao Ac, os da classe IgM são reconhecidos como bons aglutinantes, por serem pentaméricos, ou decavalentes, embora a técnica não diferencie adequadamente a classe do Ac aglutinante. Na hemaglutinação pode-se utilizar o tratamento da amostra com 2-mercaptoetanol para indicar a presença de IgM. Se o resultado do soro tratado é significativamente inferior (menos que dois títulos) ao do soro sem o tratamento, indica possível presença de IgM. Isto porque, o 2-mercaptoetanol, na concentração de 1%/30min, é um agente redutor com ação especial sobre moléculas de IgM. São propriedades do método de aglutinação semelhantes às dos testes de precipitação: o antígeno deve possuir no mínimo dois determinantes antigênicos e o excesso de anticorpo ou de antígeno resulta em falso-negativo (pró-zona). Diferentemente, na aglutinação o antígeno é insolúvel ou particulado, o teste é realizado em no máximo algumas horas e os resultados são semiquantitativos. Nas técnicas de precipitação os antígenos são solúveis, às vezes imobilizados em gel, o resultado aparece em horas ou dias e em alguns casos chega a ser quantitativo. Têm sido consideradas vantagens das técnicas de aglutinação: elevada sensibilidade, baixo custo, leitura visual e facilidade de execução. As desvantagens de reprodutibilidade dos lotes, acessibilidade para a interação Ag-Ac e estabilidade da ligação Ag/Ac no suporte têm sido superadas por muitos fabricantes, e o mercado dispõe de bons produtos. As técnicas de aglutinação, de acordo com o princípio metodológico, classificam-se em direta e indireta. Na aglutinação direta, o antígeno faz parte naturalmente da estrutura celular, como, por exemplo, antígenos eritrocitários em hemácias humanas, antígenos de membrana em protozoários, antígenos heterófilos em hemácias de carneiro etc. Na aglutinação indireta, a tecnologia permite sensibilizar partículas ou células com antígenos ou anticorpos, de modo que a partícula/célula é apenas um suporte inerte na interação Ag-Ac. São muito empregadas partículas de poliestireno (látex), carvão e gelatina e hemácias de aves ou carneiro[1].

Reação de Fixação do Complemento

A técnica é utilizada para detectar Ac fixadores de complemento. Os Ac só fixam complemento após a interação com o antígeno específico. A

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

técnica é realizada em duas etapas. Na primeira, o soro é incubado com extrato antigênico solúvel e complemento (soro fresco de cobaia). Se a amostra contiver Ac específicos fixadores de complemento, este será ativado e consumido. Em amostras negativas, o complemento permanecerá livre. Na segunda etapa do teste utiliza-se sistema hemolítico para detectar se o complemento está livre ou não. O sistema hemolítico é também constituído de um complexo Ag-Ac (hemácias de carneiro sensibilizadas com Ac anti-hemácias de carneiro). O complemento livre irá lisar as hemácias sensibilizadas (teste negativo); se o complemento for consumido na etapa anterior (teste positivo) não haverá hemólise. A técnica é trabalhosa e com grande número de variáveis, o que a torna pouco atraente para a rotina laboratorial[1].

MÉTODOS UTILIZANDO LIGANTES

Estes métodos utilizam substâncias químicas acopladas (conjugadas) a antígenos ou anticorpos, que passam a ter a característica mensurável da substância química. De acordo com as características do ligante, os testes são classificados em: fluorescentes, enzimáticos, radioativos e luminescentes[1-3].

IMUNOFLUORESCÊNCIA

Fluorocromos são moléculas capazes de absorver radiação eletromagnética ou energia luminosa, tornando-se excitadas por alteração na configuração dos elétrons. A energia absorvida geralmente é dissipada na forma de calor. Certas substâncias dissipam essa energia por emissão de fótons de luz. Este fenômeno é chamado de luminescência. Há dois tipos de substâncias luminescentes: a fosforescência, em que o tempo entre excitação e emissão é longo, e a fluorescência, em que esse tempo é menor, ou seja, antes de cessada a excitação já estará ocorrendo a emissão. A molécula fluorescente em seu estado natural apresenta vários níveis quânticos eletrônicos e vibracionais que podem ser atingidos a partir do estado fundamental E_o. A excitação dos elétrons por fótons de luz pode elevá-los a qualquer nível eletrônico mais alto, E_1. O retorno ao nível E_o se faz à custa de emissão de energia, porém com um aumento da energia vibracional.

Energia emitida $< E_1 - E_o$

Se a absorção for na região do UV, a emissão será no visível.

Os ensaios de fluorimetria podem usar a fluorescência polarizada para a excitação do fluorocromo. A molécula marcada deve ser de baixo peso molecular, de modo que a luz emitida é despolarizada, pois sendo pequena sofre maior número de rotações. A luz polarizada emite luz a 90°, e a despolarizada emite em todas as direções. Desse modo, a fluorimetria permite a dosagem de várias substâncias de baixo peso molecular. As substâncias fluorescentes podem ser conjugadas a proteínas (Ag ou Ac) sem modificar suas funções, sendo muito utilizados o isotiocianato de fluoresceína (FITC) e a lisamina-rodamina. O FITC, máximo de absorção em 495nm e emissão em 520nm (região verde no espectro visível), tem sido muito em-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

pregado pela elevada eficiência quântica e pela sensibilidade da retina humana à cor verde. Maior intensidade (brilho) da fluorescência se observa em pH alcalino, o que justifica o uso de glicerina tamponada (pH 8,0) na montagem das lâminas. O microscópio de fluorescência contém acessórios indispensáveis: fonte excitadora, conjunto de filtros (excitador e barreira) e condensador de campo escuro. A fonte excitadora emite espectro contínuo e pode ser de filamentos incandescentes de halogênio. Os filtros selecionam os comprimentos de onda, baixos para a excitação do fluorocromo na lâmina e elevados para a ocular do observador (raios UV causam lesões na retina). O filtro excitador fica entre a fonte excitadora e a preparação, e o filtro barreira fica entre a preparação e a ocular. O condensador de campo escuro possui um esquema óptico, do tipo cardióide, em que os feixes luminosos da fonte, ao atravessarem as estruturas da preparação, convergem para a ocular. Ao contrário da microscopia comum, as estruturas na lâmina de imunofluorescência são claras e o fundo escuro, o que aumenta muito a sensibilidade de detecção. A técnica requer antígenos particulados ou células que serão fixados em lâminas e deteminarão a estrutura a ser observada na microscopia. Com a utilização de um conjugado fluorescente essa estrutura estará fluorescente se houver a ligação do conjugado. A técnica requer padronização adequada da concentração do conjugado fluorescente (titulação) e treinamento do pessoal que realizará a leitura. São fatores que interferem na imunofluorescência: a) a qualidade do vidro da lâmina e da lamínula, para evitar a autofluorescência da sílica, e sua espessura, que deve ser mínima, para evitar a refração dos feixes luminosos; b) a qualidade e o tratamento a que são submetidos os antígenos fixados nas lâminas, de modo a preservar sua antigenicidade e acessibilidade; c) temperaturas e tempo de incubação; d) lavagens adequadas entre as etapas de incubação, pois resíduos de soro ou conjugado fixam-se ao vidro (são proteínas) e irão interferir na leitura final; e) a montagem da preparação em glicerina alcalina (que melhora muito a intensidade de fluorescência); e f) microscópio perfeitamente calibrado e limpo. As lâmpadas são o ponto crucial, pois à medida que são usadas vão perdendo a intensidade de luz UV emitida, comprometendo todo o teste. O alinhamento dos feixes luminosos e os filtros de excitação e barreira é outro aspecto importante para a qualidade da leitura[1-3].

Imunofluorescência Direta

É a técnica utilizada para a pesquisa de antígenos em células ou tecidos (imuno-histoquímica), usando-se conjugados compostos de anticorpos (geralmente policlonais) específicos para o antígeno em questão e marcados com fluorocromos[1-3].

Imunofluorescência Indireta

É a opção de escolha para detectar Ac circulantes específicos para os mais variados antígenos infecciosos (bactérias, protozoários, helmintos, vírus em culturas de células). Os antígenos serão fixados em lâminas, o soro contendo Ac é incubado sobre eles e esses Ac são detectados por meio de

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

imunoglobulinas específicas produzidas em animais para a classe de Ac (IgG, IgM ou IgA) marcadas com o fluorocromo. São muito empregados antígenos de *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania*, *Plasmodium*, cortes de *Schistosoma mansoni* etc.[1-3].

Imunoenzimáticos

Nestes testes, o marcador é uma enzima que na presença de um substrato altera sua cor, de modo a diferenciar o teste positivo do negativo. O nome genérico, ensaio imunoenzimático, pode significar ensaios sem fase sólida, o que significa que os imunocomplexos marcados deverão ser separados da substância marcada livre. Quando há um suporte de fase sólida o teste ganha o nome de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), de fácil realização, principalmente para detecção de Ac e de Ag circulantes, bastando ter Ag ou Ac adsorvidos ao suporte. Esquemas mais utilizados: indireto, competitivo, de captura (para pesquisa de anticorpos), sanduíche (para pesquisa de antígenos). O teste imunoenzimático pode ser aplicado em imunohistoquímica, utilizando anticorpos específicos e um substrato cromógeno que precipite sobre a estrutura antigênica detectada pelo anticorpo[1-3].

Western Blotting

É um teste imunoenzimático em que o antígeno é processado por eletroforese em gel de poliacrilamida, separando os componentes antigênicos por peso molecular. Esses componentes são transferidos para membranas de nitrocelulose (*blotting*) e nessas tiras se processa o teste. A técnica é muito utilizada para confirmar testes positivos por outros métodos, pois discrimina quais determinantes antigênicos (específicos e inespecíficos) são reconhecidos pelos anticorpos. De modo geral, ainda é uma técnica de custo elevado e, embora muito específica, tem sensibilidade menor que os testes de triagem do tipo ELISA. Para que seja padronizada é essencial que o antígeno em questão seja muito bem estudado, bem como a resposta humoral dos pacientes doentes e infectados em relação aos indivíduos do grupo-controle.

Radioimunoensaio *(RIE)*, Quimioluminescência e Outros

Desde sua introdução, há 30 anos, o RIE tem sido aplicado como instrumento de diagnóstico na prática diária do laboratório clínico, devido a sua sensibilidade, especificidade e simplicidade. A elevada sensibilidade do RIE tornou-o útil para a dosagem de hormônios e marcadores tumorais. Porém, algumas desvantagens importantes levaram à busca de alternativas, como marcador de meia-vida curta e cuidados especiais necessários com o material radioativo, desde o transporte até o descarte final. Diversas alternativas têm sido criadas, a maioria substituindo o marcador radioativo. Os ensaios imunoenzimáticos conseguiram substituir apenas parte dos testes por RIE, pois não apresentam a mesma elevada sensibilidade. Ensaios que utilizam

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

fluorescência (SLFIA, FPIA) são sensíveis e podem ser automatizados com sucesso, mas não conseguem medir adequadamente a concentração de moléculas de grande tamanho, como, por exemplo, a ferritina. São ensaios bastante adequados para monitorar drogas e hormônios com tamanho molecular pequeno. Outra limitação importante é a fluorescência natural de certos fluidos biológicos, como o plasma, que reduz a sensibilidade por interferir no sinal luminoso a ser detectado. A marcação dos anticorpos com metais pesados, como o európio, pode reduzir a interferência da fluorescência de fundo, mas diminui a velocidade de leitura do teste. A quimioluminescência é uma alternativa viável e utiliza marcadores como ésteres de acridina ou luminol ligados a anticorpos ou antígenos. As moléculas dos marcadores emitem fótons quando catalisam reações de oxidação. Essa propriedade é utilizada para a execução de testes extremamente sensíveis, chegando a detectar fentogramas de substâncias. Os testes podem ser competitivos ou do tipo "sanduíche" e, portanto, equivalentes ao RIE. Além disso, as reações são rápidas e automatizadas. Todas essas técnicas são de elevada sensibilidade para dosagens de hormônios, drogas e marcadores tumorais, mas têm sido menos utilizadas para pesquisa de anticorpos em doenças infecciosas[1-3].

PARÂMETROS DOS TESTES IMUNOLÓGICOS

Na etapa de padronização dos testes imunológicos são utilizadas amostras de referência, positivas e negativas, para a doença em questão. Portanto, na adequada escolha dessas amostras é importante definir qual será a referência padrão-ouro (*gold standard*). Por exemplo, são amostras positivas para cisticercose aquelas de pacientes em que é visualizada a estrutura do parasito (biópsia, exames de imagem). Outro aspecto a ser considerado é a inclusão de amostras de pacientes em diferentes fases de evolução da infecção/doença. O grupo-controle de negativos deve incluir amostras de indivíduos submetidos às mesmas condições ambientais dos futuros pacientes que utilizarão o teste. Igualmente, o teste deve ser ensaiado com amostras de pacientes com infecções por patógenos que tenham similaridade antigênica. Por exemplo, em um teste para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, deve ser considerada a infecção por *Trypanosoma cruzi*, entre outras. A partir dos resultados dessa padronização são definidos os parâmetros do teste. Esses índices irão auxiliar a interpretação dos resultados obtidos com amostras desconhecidas. Evidente que, quando da execução do teste, é necessário seguir rigorosamente o protocolo padronizado com a inclusão de controles positivo e negativo.

Limiar de reatividade: também chamado de *cut-off* ou ponto de corte. Define o valor do resultado que separa um resultado positivo de um negativo. Por exemplo, um *cut-off* de 0,200 na leitura de um teste imunoenzimático significa que resultados > 0,200 são positivos e aqueles < 0,200 são negativos. Em alguns testes, é incluída a região de resultados indeterminados ou inconclusivos, por exemplo, ±10% do *cut-off*, que no exemplo anterior significa leituras entre 0,180 e 0,220. Esses resultados indicam a necessidade de realizar exames adicionais ou a repetição do teste em amostra coletada pos-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

teriormente. Na Tabela 29.1 é apresentado o resultado de um teste imunológico padronizado com amostras de indivíduos com uma doença e de indivíduos sem a doença (controle). Lembramos que é comum denominar o teste positivo de Reagente e o negativo de Não-reagente.

Sensibilidade: é a porcentagem de resultados positivos obtidos nas amostras da população de doentes, ou seja: A/A+C.

Especificidade: é a porcentagem de resultados negativos obtidos nas amostras da população controle negativo para a doença, ou seja: D/B+D.

Eficiência: refere-se à porcentagem de resultados verdadeiros, positivos e negativos, obtidos no total de amostras estudadas, ou seja: A + D/A + B + C + D. De modo geral, os testes de elevada sensibilidade são escolhidos para triagem da infecção, ou seja, quando não se pode ter resultados falso-negativos. É o caso de testes realizados em banco de sangue. Já os testes confirmatórios ou de certeza diagnóstica requerem testes de elevada especificidade, ou seja, não devem apresentar falsa positividade[1-3].

SIMPLICIDADE E CUSTO DOS TESTES IMUNOLÓGICOS

Tão importante quanto a eficiência diagnóstica, os testes imunológicos devem apresentar custo acessível, pois a população mais beneficiada com essa metodologia é justamente a de baixa renda. Espera-se facilidade no processo de execução e realização do teste. Os testes diagnósticos de parasitoses devem ser realizados em laboratórios sem complexidade; de preferência devem poder ser realizados em campo, ou seja, sem a necessidade de equipamentos. Ainda permanece como área de interesse o desenvolvimento de testes rápidos e a utilização de amostras biológicas de fácil obtenção, como saliva ou sangue total de punção de polpa digital em papel-filtro.

TESTES IMUNOLÓGICOS NAS INFECÇÕES PARASITÁRIAS

Diversos fatores devem ser considerados no desenvolvimento de testes imunológicos para diagnóstico de infecções parasitárias. Esses fatores são determinantes na eficiência do teste utilizado e, infelizmente, nem sempre todos são conhecidos, o que nos deixa ainda com poucas alternativas de testes imunológicos para as numerosas parasitoses importantes em Saúde Pública, a saber:

Tabela 29.1
Resultado de Teste Padronizado

Teste	*Doença* *Presente*	*Ausente*	*Total*
Reagente	A	B	A + B
Não-reagente	C	D	C + D
Total	A + C	B + D	A+B+C+D

Verdadeiros positivos: A Falso-positivos: B
Verdadeiros negativos: D Falso-negativos: C

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Relação parasito/hospedeiro: bastante complexa e diversificada em razão das variáveis da espécie humana.

Intensidade e localização do parasitismo: é conhecido que a resposta imunológica depende da intensidade do estímulo antigênico. Além disso, quando o parasito se localiza em estruturas privilegiadas, como globo ocular ou sistema nervoso central, a resposta imunológica pode ser apenas local, requerendo a coleta de material biológico desse sítio (humor aquoso e líquido cefalorraquidiano). A coleta desse material requer profissional especializado e deve ser realizada em condições adequadas, o que nem sempre é acessível à população.

Ciclo biológico: a fase de evolução do parasito (embrião, larva, verme adulto, cisto etc.) e as variações antigênicas entre as cepas representam outra dificuldade para a padronização dos testes imunológicos.

Escolha do material biológico e conservação da amostra a ser examinada: dependendo do elemento a ser detectado (antígeno parasitário ou anticorpo produzido pelo hospedeiro), teremos várias dificuldades na obtenção e, principalmente, na conservação do material coletado.

a. No caso da pesquisa de anticorpos, a situação é melhor, pois o material a ser coletado é geralmente o sangue, e as imunoglobulinas são bastante estáveis quando mantidas em temperaturas baixas e congeladas a -20°C podem manter suas características por muitos meses. Esse requisito pode ser difícil em áreas carentes, até de energia elétrica, e são essas as áreas onde estudos soroepidemiológicos são mais necessários. Ainda faltam estudos que permitam a utilização rotineira de sangue colhido por punção da polpa digital em papel de filtro. Alguns estudos soroepidemiológicos foram realizados com esses eluatos, mas a utilização do material para pesquisa de anticorpos no diagnóstico da infecção ainda deve ser aprimorada.

b. Já a escolha do material biológico para a pesquisa de antígenos pode requerer procedimento mais invasivo, como biópsia. No caso de material fecal, o problema é o uso de conservantes e antimicrobianos que podem modificar os antígenos parasitários, que então não serão detectados. Por outro lado, a variada flora de antígenos e a presença de resíduos alimentares, que também são estruturas antigênicas, fazem do material fecal um material biológico de difícil padronização para testes imunológicos, salvo raras exceções.

Mecanismos de evasão parasitária: os parasitos têm no mecanismo de escape da resposta de defesa do hospedeiro um dos principais mecanismos de sobrevivência. São comuns a variação antigênica, a adsorção de proteínas do hospedeiro, a atração de colágeno e fibrina, formando cápsula protetora, a composição antigênica pouco imunogênica e inibidora de fagocitose e fixação de complemento, a liberação local de substâncias supressoras da resposta do hospedeiro, a localização intracelular de alguns protozoários, a indução de resposta do tipo supressora, entre outras. Essa supressão pode traduzir-se em uma resposta imunológica menos intensa e que pode não ser detectada pelos testes imunológicos.

Hospedeiro humano: é muito complexa a resposta de defesa do ser humano, sendo também diversificada entre os indivíduos. Essa variabilidade deve ser superada na padronização dos testes imunológicos, pois serão aplicados a um grande número de amostras. São variáveis que devem ser con-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

sideradas: o *status* imune (idade, co-infecções, sexo, imunocompetência, imunodeficiência, predisposição a fenômenos alérgicos etc.) e mecanismos inespecíficos inflamatórios. Quando pensamos em hospedeiros animais, envolvidos no ciclo biológico do parasito, ainda é pouco conhecida a resposta imunológica. Muitos animais estão adaptados ao parasitismo e não apresentam alterações sintomáticas ou lesões teciduais importantes. É certo que há grandes diferenças entre as infecções animal e humana, sendo esta última muito mais complexa quanto ao sistema de defesa e interações biológicas com o parasito.

Papel da resposta imune: muitas vezes é a imunopatogenia que explica as lesões graves da infecção parasitária. Em infecções crônicas é comum o aparecimento de fenômenos de auto-imunidade, responsáveis por danos adicionais ao hospedeiro.

Cinética da produção de anticorpos e perfil imunológico da infecção: também são afetados pela variabilidade individual do hospedeiro. O adequado conhecimento desses fatores estabelece o que chamamos de marcadores imunológicos da infecção. Esses marcadores dizem respeito às classes, subclasses e avidez das imunoglobulinas produzidas, antígenos envolvidos em cada fase da infecção, intensidade da resposta ao longo do tempo etc. Muitas vezes esses marcadores conseguem auxiliar também no prognóstico e acompanhamento terapêutico da infecção parasitária.

Parâmetros do método imunodiagnóstico: a eficiência de um teste imunológico depende da sensibilidade e da especificidade desse teste. Esses parâmetros são obtidos durante a etapa de padronização do teste, incluindo a etapa de uso em campo, em que vários laboratórios utilizam o teste antes da sua comercialização[1-3].

TESTE DE HIPERSENSIBILIDADE IMEDIATA

A composição antigênica dos parasitos, especialmente dos helmintos, ativa a resposta Th2 (linfócitos T-*helper* 2), liberando interleucina (IL-4, IL-5 e IL-6) e induzindo ativação e diferenciação de linfócitos B a secretar Ig, dentre as quais é freqüente o achado de IgE, possivelmente dependente dos antígenos de tegumento dos helmintos. Devido a essas características, foram propostos testes *in vivo* de hipersensibilidade imediata para o diagnóstico de infecções sistêmicas por helmintos, como na hidatidose — teste de Casoni. Resumidamente: injeta-se via intradérmica pequeno volume de antígeno e se observa a formação de eritema com ou sem prurido, em 15 a 30 minutos. A dificuldade de padronização e de obtenção de preparações adequadas de antígenos, os elevados índices de testes falso-positivos e falso-negativos e o risco de induzir respostas graves fizeram com que esses testes tivessem menor aplicação diagnóstica.

TESTE DE HIPERSENSIBILIDADE TARDIA

Como em toda resposta imune complexa, nas infecções parasitárias há participação da resposta celular T e de macrófagos. A injeção subcutânea

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

de antígenos no paciente previamente sensibilizado irá promover a migração celular para esse local, em 24-72 horas, formando uma pápula ou um nódulo, constituído por essas células. Na persistência do antígeno forma-se uma reação granulomatosa. Nos pacientes com maior reatividade é comum a extensa hiperemia no local da enduração, bem como formação de flictenas e até necrose tecidual. De modo geral, a intensidade da resposta é proporcional à intensidade do estímulo antigênico, mas tanto pode indicar imunização prévia como infecção presente[1-3].

OUTROS TESTES DE IMUNIDADE CELULAR

A utilização de técnicas de estudo da imunidade celular ainda é restrita à investigação de mecanismos de patogenicidade. A técnica de estimulação de linfócitos em cultura com antígenos específicos, linfoblastogênese, mede a proliferação induzida e permite a determinação de citocinas no sobrenadante da cultura. A dosagem de citocinas, como interleucinas e interferons, pode auxiliar na compreensão dos mecanismos de defesa contra os patógenos. A citometria de fluxo permite a identificação do perfil de células envolvidas na infecção nas diferentes fases e também pode auxiliar a elucidar mecanismos de imunopatogenicidade[1-3].

MARCADORES IMUNOLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO DE ALGUMAS INFECÇÕES PARASITÁRIAS

Protozoários

Amebíase

Entamoeba histolytica é a única da classe *Lobozia* que é considerada patogênica. A amebíase é de distribuição mundial, com predomínio nas regiões tropicais. Os sintomas clínicos surgem em cerca de 10% dos infectados e se caracterizam por sintomas gastrintestinais, disenteria e colites. Dentre os pacientes sintomáticos, 2% a 10% evoluem para a forma invasiva extra-intestinal, de elevada letalidade, com formação de abscessos, principalmente no fígado. Essa forma parece ser freqüente no Oriente Médio, na África e na Índia. São características imunológicas da amebíase: a) anticorpos circulantes são detectados em pacientes com as formas extra-intestinais e invasivas da mucosa intestinal; b) esses anticorpos podem indicar infecção atual (IgM, IgE, IgG) ou passada (IgG e IgE); c) testes de hipersensibilidade imediata (IgE) e tardia (celular) podem ser utilizados, mas a padronização de antígenos adequados é difícil; d) pacientes com abscessos amebianos apresentam resposta de hipersensibilidade tardia menos intensa, sugerindo possíveis eventos de supressão imune desencadeados por antígenos parasitários; e) essa supressão é abolida após a cura; f) o papel protetor da imunidade parece importante em pacientes curados de abscessos hepáticos indicando participação da resposta celular T; e g) em pacientes com elevados níveis de anticorpos podem ocorrer reinfecção com a forma intestinal, mas parecem não desenvolver formas invasivas, indicando imunidade parcial.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

A elevada prevalência de portadores sadios transmitindo a infecção pode ser reduzida pelo diagnóstico parasitológico e a instituição terapêutica adequada. O diagnóstico direto das formas vegetativas e cistos nas fezes ainda é dificultado por falhas técnicas de colheita, preservação e transporte. A terapêutica, geralmente com metronidazol, requer aderência do paciente, esquema prolongado e custo elevado. Devido às dificuldades do diagnóstico direto, a pesquisa de antígenos específicos em fezes, utilizando testes imunológicos, é de grande utilidade, embora ainda necessite melhores avaliações em uso em larga escala. Em amostras de aspirados de abscessos hepáticos podem ser realizados métodos de identificação por coloração, imunohistoquímica com anticorpos marcados, cultura para isolamento e testes imunológicos para detecção de antígenos.

Os testes imunológicos para pesquisa de anticorpos são úteis nas formas extra-intestinais da amebíase. O teste ELISA é o que melhores resultados apresenta, com sensibilidade de cerca de 90% em amostras de soro de pacientes com amebíase hepática e de cerca de 70% em amostras de pacientes com a forma invasiva que geralmente apresentam sintomas de disenteria e colite. Portadores do parasito exclusivamente intestinal não produzem anticorpos em níveis significativos. A detecção de anticorpos IgM específicos parece ser um bom marcador de infecção recente. A utilização de técnicas moleculares (*polimerase chain reaction*, sondas) representa importante perspectiva diagnóstica para o controle da parasitose[4-6].

Doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado, que se desenvolve no tubo digestivo de vetores insetos da subfamília Triatominae e é transmitido na forma de tripomastigota metacíclico pelo contato direto com as fezes do vetor. Originariamente, era encontrado em diversas espécies de animais silvestres e atingiu a espécie humana, quando se pôde determinar quadros crônicos inaparentes ou graves (forma cardíaca e forma digestiva com megaesôfago e megacólon). Outra forma de infecção que preocupa as autoridades sanitárias de países onde a infecção é prevalente é a transmissão via parenteral, implicando o uso de testes de triagem em bancos de sangue, clínicas de hemoterapia e em transplantes. Países que recebem imigrantes de áreas endêmicas podem apresentar casos autóctones pelos mesmos motivos. A transmissão vertical é possível e os parasitos já foram encontrados em leite materno de mulheres infectadas.

No Brasil, estima-se que cerca de cinco milhões de indivíduos estão infectados, localizados principalmente nas áreas onde os vetores *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus* estão presentes. Uma das características imunológicas na doença de Chagas mais interessantes é o desenvolvimento de auto-imunidade envolvendo antígenos das células infectadas em processos crônicos de longa duração, exacerbando assim os mecanismos de imunopatogenicidade. Os métodos parasitológicos são confirmatórios da infecção pelo *T. cruzi*, destacando-se a pesquisa direta em gota espessa, *quantitative buffy coat*, inoculação em peritônio de camundongo, isolamento em cultura, xenodiagnóstico e *polymerase chain reaction* (PCR).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Os testes imunológicos para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* são amplamente empregados para selecionar doadores em bancos de sangue, para acompanhamento terapêutico, para fins sociais na seleção de trabalhadores, para confirmar ou excluir suspeita clínica e para inquéritos epidemiológicos. A complexidade antigênica do parasito e a variação imunológica do hospedeiro tornam difícil o diagnóstico sorológico de certeza e indicam a necessidade de criteriosa avaliação clínica com exames radiológicos e, se possível, isolamento do parasito para definição do caso. Vários testes foram utilizados para o diagnóstico imunológico da doença de Chagas, como a reação de fixação de complemento, precipitação e aglutinação direta e foram substituídos por outros de metodologia com maior reprodutibilidade e sensibilidade, como imunofluorescência indireta, hemaglutinação passiva e testes imunoenzimáticos, ELISA e dot-ELISA. O emprego da tecnologia de *western blot* pode auxiliar na confirmação da especificidade dos anticorpos encontrados e alguns peptídeos (membrana e flagelo) têm sido considerados promissores para esse fim. Essa elevada especificidade é desejada especialmente em áreas onde ocorre infecção por *Leishmania*. De modo geral, ainda se utilizam antígenos da forma epimastigota do parasito, facilmente obtida em meio de cultura, com a vantagem de não possuir virulência. Antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos têm sido utilizados em alguns trabalhos e parecem ser promissores para elevar a especificidade dos testes de triagem. Os testes de imunofluorescência e ELISA permitem a análise de marcadores imunológicos. Anticorpos da classe IgG estão associados a todas as fases da infecção, úteis em estudos epidemiológicos e de triagem, IgM nas fases iniciais (aguda/recente) e IgA relacionados com a forma crônica digestiva. As técnicas de aglutinação permitem a detecção concomitante de anticorpos IgG e IgM, úteis portanto na triagem de doadores, por identificarem todas as fases da infecção. Na triagem de doadores de sangue e em transplantes, recomenda-se o uso de pelo menos dois testes imunológicos de metodologia diferente, a utilização de antígenos flagelares e de membrana, mais precoces na imunogenicidade e a escolha de *cut-off* adequado para elevada sensibilidade do diagnóstico.

Doadores que tenham tido testes positivos de triagem devem ser investigados minuciosamente, pois são freqüentes os resultados falso-positivos. A detecção de antígenos em urina de pacientes tem sido proposta como alternativa suplementar no diagnóstico e acompanhamento terapêutico dos pacientes com doença de Chagas[21-29]. (Ver Capítulo 13.)

Leishmaniose

A leishmaniose é causada por protozoários intracelulares do sistema reticuloendotelial. As espécies do complexo *Leishmania tropica*, *L. major*, *L. brasiliensis* e *L. mexicana* comumente estão envolvidas na forma tegumentar e mucocutânea.

Na forma visceral, ou calazar, as espécies *L. donovani*, *L. chagasi* e *L. infantum* são as causadoras da doença. A *Leishmania*, após ser introduzida na pele pela picada do inseto do gênero *Lutzomyia*, é fagocitada pelos macrófagos, processada e apresentada a linfócitos T e, dependendo da espécie e da sus-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

cetibilidade do hospedeiro, haverá predomínio da resposta Th1 ou Th2. Na resposta Th1, presente na forma tegumentar, o perfil de citocinas presentes é de IL-2, γ-IFN e IL-12, regulando a resposta para hipersensibilidade tardia com manutenção da infecção ao nível da pele. Quando há predomínio de resposta Th2, há excesso de IL-4 e IL-10 com aumento da resposta humoral e menor quantidade de ativação macrofágica, permitindo a disseminação de parasitos e a infecção de maior número de células. A resposta Th2 é mais intensa na forma visceral. Os mecanismos imunopatogênicos observados na leishmaniose servem de modelo para estudo da complexa relação parasito/hospedeiro e do papel da resposta imune nas lesões teciduais. São exemplos dessas características a invasão da mucosa e do tecido cartilaginoso, na forma tegumentar, dependente de mecanismos de hipersensibilidade, e a alergia observada na forma visceral.

No diagnóstico laboratorial da leishmaniose, além dos exames complementares hematológicos e bioquímicos, são empregados exames parasitológicos e testes imunológicos. Na forma aguda da leishmaniose visceral, o hemograma costuma mostrar anemia, leucopenia e plaquetopenia, aumento da atividade sérica de enzimas hepáticas; a eletroforese de proteínas apresenta aumento da fração gamaglobulina. Nas formas crônicas e na leishmaniose tegumentar, essas alterações são menos observadas. O exame parasitológico confirma a infecção pela *Leishmania*, por métodos diretos de identificação do parasito em amostras de tecidos (aspirado de medula óssea ou baço, biópsia ou *imprint* de tecidos), utilizando métodos de coloração ou imuno-histoquímicos. O isolamento do parasito por cultivo em meios de cultura ou por inoculações em hamsters ou camundongos suscetíveis também é considerado método direto de diagnóstico da leishmaniose. Exames histopatológicos evidenciam alterações do sistema linfomononuclear e quando há intenso parasitismo podem ser vistas formas amastigotas de *Leishmania* no interior das células mononucleares.

A detecção de antígenos por sondas moleculares específicas de DNA do cinetoplasto após amplificação gênica do material a ser examinado poderá constituir mais um marcador de diagnóstico e de prognóstico da leishmaniose. São características imunológicas da leishmaniose tegumentar: a imunidade mediada por células e a quantidade mínima de anticorpos produzidos. Na leishmaniose visceral a hipersensibilidade tardia ocorre apenas após a cura ou terapêutica eficaz, observa-se hipergamaglobulinemia com anticorpos específicos e imunoglobulinas inespecíficas de ativação policlonal. Considerando as características imunológicas da leishmaniose, os testes imunológicos são utilizados no diagnóstico e em estudos soroepidemiológicos.

De modo geral, a pesquisa de anticorpos séricos tem maior significado no diagnóstico e acompanhamento da forma visceral e o teste de hipersensibilidade tardia para a forma tegumentar (mucocutânea). O teste intradérmico de Montenegro, utilizando antígenos de *L. chagasi*, também apresenta reatividade para pacientes curados de leishmaniose visceral. Já o uso de antígenos de *L. brasiliensis* resulta em reação de Montenegro positiva para a maioria dos indivíduos com leishmaniose mucocutânea nas Américas. Ou seja, a sensibilidade, a especificidade e a diferenciação entre as formas de leishmaniose dependem também dos antígenos empregados nos testes. Os

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

antígenos das diferentes espécies de *Leishmania* são divididos em comuns e em espécie-específicos. Na triagem sorológica, são utilizados testes de imunofluorescência indireta e ELISA, o primeiro com parasitos íntegros obtidos por cultivo e o segundo com extratos solúveis desses parasitos.

Os testes utilizando antígenos brutos freqüentemente apresentam reatividade cruzada com doença de Chagas e mais raramente com tuberculose e hanseníase. No teste ELISA é possível utilizar antígenos purificados de *Leishmania*, como HSP70, 42kDa e gp63, o que aumenta a especificidade do resultado. A identificação de anticorpos específicos para o antígeno recombinante K-39 parece ser um bom marcador de atividade na leishmaniose visceral[44-51]. (Ver Capítulo 14.)

Toxoplasmose

O agente etiológico da toxoplasmose, *Toxoplasma gondii*, é um protozoário intracelular e presente em líquidos somáticos, exceto em hemácias, com tropismo por células embrionárias e tecido nervoso. A infecção é universalmente disseminada, principalmente entre aves e mamíferos, com elevada prevalência entre os humanos. Como em muitas parasitoses, a gravidade dos sintomas clínicos depende da virulência da cepa parasitária e da resistência do hospedeiro. Destacam-se como formas graves o comprometimento ocular, a forma congênita por transmissão placentária e, mais recentemente, a forma de reativação, observada entre indivíduos imunocomprometidos, pela presença do HIV ou pelo uso de imunossupressores, especialmente entre os transplantados.

O parasito possui duas formas, os trofozoítos e esporozoítos, de multiplicação rápida e destruição das células infectadas e disseminação por via hematogênica, e os bradizoítos, de multiplicação intracelular lenta, formando cistos que se estabelecem definitivamente no hospedeiro. A ingestão de carne contendo esses cistos parece ser a forma mais comum de infecção humana ao lado da contaminação de alimentos e água com oocistos contendo esporozoítos eliminados em fezes de gato, o hospedeiro definitivo do *T. gondii*. A transmissão por transplante de órgãos contendo cistos e a transmissão placentária em gestantes com elevados níveis de trofozoítos (fase aguda) são de especial importância em Saúde Pública, requerendo a triagem sorológica obrigatória de doadores, receptores e gestantes.

A toxoplasmose adquirida em indivíduos imunocompetentes costuma passar desapercebida, com sintomas brandos, ou com marcante linfadenopatia, muitas vezes semelhante à síndrome tipo-mononucleose. O chamado perfil TORCH de testes imunológicos é muito solicitado na vigência dessa síndrome (toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, herpes vírus, entre outras). Em alguns casos de toxoplasmose aguda há comprometimento ocular e manifestações meningoencefálicas, pulmonares, hepáticas e cardíacas. De modo geral, o desenvolvimento da imunidade humoral e celular restringe a ação patogênica do parasito, que assume a forma cística de resistência que caracteriza a fase crônica, forma latente e permanente. Assim, mesmo nos indivíduos assintomáticos, a queda da resistência do sistema de defesa torna possível a reativação desses cistos e os parasitos liberados podem invadir tecidos e causar sinto-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

mas graves. A forma ocular, retinocoroidite, pode manifestar-se em razão da presença de cistos latentes e de fenômenos de natureza imunológica. Os indivíduos com deficiência imunológica comumente apresentam sintomas graves, com disseminação e elevada letalidade por meningoencefalites, seja na infecção primária, seja na reativação do processo crônico.

O diagnóstico laboratorial utiliza técnicas de detecção de anticorpos, mas em algumas situações de difícil esclarecimento e na forma de reativação podem ser necessários exames de identificação direta do parasito. O isolamento do *Toxoplasma* pode ser realizado em amostras de sangue, de preferência da camada leucocitária, sedimentos de líquido cefalorraquidiano, líquido amniótico, lavado brônquico-alveolar, humor aquoso intra-ocular, triturados de biópsia ou placenta. Utilizam-se a inoculação em peritônio de camundongos ou em culturas celulares de fibroblastos humanos, a pesquisa de antígenos por técnicas imunocitoquímicas e a reação em cadeia da polimerase. Os testes imunológicos na toxoplasmose são de uso em larga escala e diversos marcadores têm sido utilizados para melhor estabelecer os perfis das infecções aguda, crônica ou latente, ocular, do sistema nervoso, de forma congênita e de reativação.

Desde a padronização do teste do corante Sabin-Feldman, que utilizava o princípio da reação de fixação de complemento, vários métodos vêm sendo utilizados para o diagnóstico da toxoplasmose, como hemaglutinação, imunofluorescência indireta e imunoenzimático ELISA. Para a detecção de anticorpos IgM e IgA, o teste ELISA é realizado pelo princípio da captura de imunoglobulinas. Os antígenos empregados são o parasito íntegro para a imunofluorescência e extratos solúveis para a hemaglutinação e ELISA. Antígenos purificados de membrana, como o peptídio de 30kDa, p30, são muito específicos e são os mais precocemente reconhecidos pelos anticorpos. A identificação do p30 também pode ser realizada pelo *imunoblot*.

A avidez dos anticorpos IgG pode ser medida pelo teste ELISA; em paralelo realizam-se dois testes: um normal, e no outro se utiliza uma solução caotrópica, como uréia 6M, nas lavagens após a incubação do antígeno com a amostra. IgG de baixa afinidade se dissocia do antígeno na presença da uréia, diminuindo assim a leitura do teste em relação ao teste-controle. O índice de avidez é calculado em relação à queda de reatividade, ou seja, quanto menor a avidez, menor a reatividade no teste com agente dissociante. Anticorpos IgG de baixa afinidade são produzidos no início da resposta imune primária. Gradativamente ao longo do tempo são selecionados os clones de linfócitos B produtores de IgG de elevada afinidade. O termo avidez refere-se ao conjunto de afinidades dos anticorpos, ou seja, a amostra de soro indica maior ou menor avidez em relação aos antígenos. Anticorpos das classes IgA e IgE vêm assumindo importância como marcadores de infecções ativas. Na toxoplasmose, IgA anti-*Toxoplasma* está associada à infecção aguda e parece desaparecer antes mesmo da IgM. Testes para detectar IgE específica na toxoplasmose ainda não estão disponíveis.

A toxoplasmose apresenta três perfis distintos de marcadores humorais IgG e IgM.

O **perfil I** está presente na soroconversão recente e caracteriza-se pela presença de IgM e IgG. Na fase muito inicial pode não ser detectada a IgG

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

e em razão da menor especificidade da IgM detectada, pode ser útil a repetição do teste com amostra coletada em intervalos de 7-15 dias para surpreender o aparecimento de IgG e confirmar a positividade de IgM. Nessa fase, anticorpos IgG são de baixa avidez.

O **perfil II**, de transição, apresenta elevados níveis de IgG com índices de avidez crescentes ao longo do tempo e redução gradativa da IgM. O emprego do teste ELISA de captura de IgM, pela elevada sensibilidade, pode mostrar reatividade muito prolongada, por meses, dificultando a definição adequada da fase da infecção. No caso de gestantes, já no segundo ou terceiro trimestre gestacional, que estejam fazendo o teste pela primeira vez e das quais se desconheça a história prévia da toxoplasmose, pode haver dificuldade em estabelecer a importância de resultado positivo de IgM nessa fase. Nesses casos, a ausência de anticorpos IgA, que desaparecem mais rapidamente, e o achado de elevado nível de avidez dos anticorpos IgG podem definir o caso. Os testes diretos podem ser outra opção suplementar nessa situação.

Finalmente, o **perfil III**, característico da infecção latente ou crônica, apresenta apenas anticorpos IgG, geralmente em baixos títulos e com elevada avidez.

Na triagem sorológica de gestantes, o ideal seria o teste antes da gravidez ou o mais precocemente possível, facilitando a interpretação dos resultados. Devem ser utilizados testes para pesquisa de IgG e IgM. As gestantes soronegativas devem ser acompanhadas ao longo da gestação e orientadas quanto aos cuidados profiláticos da toxoplasmose. A presença de IgG e ausência de IgM geralmente indicam infecção crônica, sem risco de transmissão placentária. É a presença de IgM que sugere infecção aguda ou recente, sendo difícil estabelecer o período em que ocorreu a parasitemia de risco para infecção fetal. Nesses casos, podem ser necessários testes complementares, como determinação de anticorpos IgA e do índice de avidez da IgG, e até exames diretos de detecção do parasito. Na vigência de suspeita, o diagnóstico e o tratamento da toxoplasmose congênita são importantes para prevenir lesões cerebrais e oculares que podem ocorrer, ainda que de forma assintomática, devido à maior suscetibilidade do neonato, mesmo quando ele não apresenta sinais aparentes da doença. No recém-nascido infectado, o *Toxoplasma* pode ser isolado na camada leucocitária de sangue. O exame da placenta, mostrando os parasitos, também é útil. Os anticorpos IgG detectados são em parte maternos e a detecção de IgM confirma a infecção intra-uterina. No entanto, devido à imaturidade imunológica, muitos neonatos não produzem IgM. A detecção de IgA parece ser mais sensível nesses casos, mas o emprego de técnicas de Biologia Molecular ainda é a perspectiva mais promissora para o diagnóstico precoce e eficiente da toxoplasmose congênita.

O diagnóstico imunológico da toxoplasmose ocular é mais difícil. Se o paciente apresenta anticorpos IgM indicando fase aguda/recente da infecção, a certeza do comprometimento ocular pode ser presumida. Já na fase crônica, a etiologia da lesão ocular pode requerer exames diretos de isolamento do parasito ou o achado de anticorpos no humor aquoso. É recomendado que se determinem as concentrações de IgG sérica e no humor aquo-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

so, bem como os títulos de anticorpos em cada compartimento, para cálculo do índice de produção intra-ocular de anticorpos.

Outra forma de complexa interpretação diagnóstica é a que ocorre em imunocomprometidos, seja na infecção primária seja na reativação de cistos parasitários presentes nos tecidos do hospedeiro. Esses indivíduos muitas vezes apresentam resposta imune anômala, dificultando ainda mais a definição do perfil da infecção. A elevação dos títulos de IgG é observada em alguns pacientes, assim como o reaparecimento de anticorpos IgA, IgM e até IgE. Na encefalite toxoplásmica, o estudo do líquido cefalorraquidiano pode ser elucidativo, tanto para a pesquisa de anticorpos de produção intratecal como para isolamento e identificação direta do parasito[52-63].

Helmintos

Cisticercose

A cisticercose humana representa importante problema de Saúde Pública em áreas carentes de condições sanitárias e de Políticas de Saúde. Não temos, no entanto, dados estatísticos suficientes sobre a incidência, que nos possibilitem visualizar de forma precisa a situação dessa parasitose no país. A dificuldade em detectar e notificar os casos da doença advém da necessidade de confirmação diagnóstica por procedimentos de custo elevado, pouco disponíveis e inacessíveis para grande parcela da sociedade.

O ser humano é o único hospedeiro do verme adulto, *Taenia solium*, e elimina ovos nas fezes, contaminando o meio ambiente. No suíno, após ingestão dos ovos, o embrião liberado, com a ruptura da casca quitinosa calcária, no intestino delgado atravessa a mucosa por meio de seus acúleos e alcança tecidos e órgãos, desenvolvendo-se até a forma larvária, cisticerco. Completando o ciclo, o ser humano ingerindo carne suína com cisticercos viáveis permitirá o desenvolvimento do verme adulto a partir da fixação das ventosas e acúleos do parasito na mucosa intestinal. Acidentalmente ocorre a cisticercose humana, associada a maus hábitos de higiene, presença de portadores de teníase, água e alimentos contaminados. Cisticercos de *Taenia solium* têm sido observados no globo ocular, músculos e sistema nervoso central, sendo a neurocisticercose a mais freqüentemente relatada com 60% a 90% dos casos, possivelmente pela gravidade dos sintomas que leva o paciente a buscar auxílio médico. No Brasil, vários autores têm descrito a cisticercose como relevante problema sanitário e médico, sendo possível que melhores investigações revelem casos em todo o território nacional. Entre os pacientes com neurocisticercose predomina a faixa etária de 21 a 40 anos, economicamente produtiva, o que revela o impacto social da parasitose. O período de hospitalização desses pacientes é em média de nove a 28 dias por ano, com letalidade estimada entre 5% e 25%. A sintomatologia apresentada depende do número, tamanho, idade, vitalidade, localização, estágio de evolução do parasito e seus processos reacionais sobre o hospedeiro, além das respostas imune-inflamatórias do hospedeiro ao parasito. As apresentações clínicas mais freqüentes são: convulsão, hipertensão intracraniana, hidrocefalia, demência, meningite e paresias, isoladas ou associadas.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

A neurocisticercose apresenta-se com mecanismo fisiopatogênico do tipo repetitivo e os surtos de agudização, com exacerbação da resposta imune detectada no líquido cefalorraquiano (LCR), verificam-se quando da morte e degeneração do parasito, com liberação maciça de antígenos e quadro clínico meningítico, em decorrência da resposta imune-inflamatória do hospedeiro. O diagnóstico clínico da neurocisticercose é dificultado pela sintomatologia polimórfica e inespecífica e quase sempre necessita de exames complementares para determinar a etiologia. Os exames de imagem, tomografia axial computadorizada e ressonância magnética nuclear permitem a visualização de estruturas do parasito e do processo reacional do hospedeiro. As infecções do sistema nervoso central podem ser acompanhadas de alterações extracelulares que podem ser investigadas no líquido extravascular cerebral, ou de modo indireto pelo estudo do LCR, que reflete essas alterações.

A pleocitose observada no LCR é, geralmente, do tipo linfomononuclear com eosinófilos e neutrófilos; a proteinorraquia revela padrão do tipo gama poli e oligoclonal, à custa de anticorpos específicos que podem ser detectados por vários testes, mas aqueles mais sensíveis, como o teste imunoenzimático ELISA, são recomendáveis e amplamente utilizados. A sensibilidade e a especificidade relatadas são de 90% a 100% para o teste realizado no LCR, enquanto a detecção de anticorpos no soro apresenta menor especificidade, principalmente em populações com outras infecções parasitárias.

O teste ELISA tem sido o mais estudado no imunodiagnóstico da neurocisticercose pela elevada sensibilidade de seus resultados e com vantagens de especificidade para o uso do LCR como amostra de investigação. O *imunoblot* tem sido utilizado no estudo da neurocisticercose observando-se diferentes índices de sensibilidade e eficiência, muitas vezes em função da preparação antigênica, do tipo e gravidade das lesões e da reação inflamatória envolvendo o parasito, e menor eficiência é observada na forma calcificada.

A pesquisa de antígenos de cisticercos, principalmente de excreção e secreção, ampliaria as perspectivas de estudo dos mecanismos imunopatogênicos da neurocisticercose. No entanto, esses métodos requerem ainda melhores avaliações. Embora os testes imunológicos para uso em LCR apresentem excelente utilidade no diagnóstico da neurocisticercose, a colheita de amostras de LCR é procedimento invasivo que requer profissional especializado em local adequado. Por sua vez, a utilização de amostras de soro tem apresentado baixos índices de especificidade e reações cruzadas. Por isso, a detecção de anticorpos específicos, em amostras de soro de pacientes com suspeita de cisticercose representa importante área onde a padronização de testes deve contribuir para a ampliação dos recursos diagnósticos e de estudos epidemiológicos, inclusive na Veterinária, em amostras de soros de suínos. A obtenção de antígenos adequados e em quantidade suficiente para garantir homogeneidade e controle de qualidade dos lotes antigênicos é dificultada pelo tedioso método de extração dos cisticercos a partir de suínos naturalmente infectados, geralmente abatidos clandestinamente. A forma larvária da *Taenia crassiceps*, mantida por reprodução assexuada em peritônio de camundongos, é um importante modelo de laboratório para os estudos da interação hospedeiro/parasito e dos antígenos para uso em diagnóstico e

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

vacinação na cisticercose. A demonstração de reações cruzadas, observadas entre os antígenos de cisticercos de *Taenia solium* e *Taenia crassiceps*, sugere que os parasitos partilham epítopos importantes, presentes em concentrações suficientes para o uso como fonte de antígeno em testes imunológicos. A caracterização de antígenos de líquido vesicular de cisticercos de *Taenia crassiceps* por SDS-PAGE mostra composição complexa com mais de 20 peptídeos de 200 a 22kDa, alguns deles sendo glicopeptídeos, cerca de 50% desse conteúdo com peso molecular inferior a 30kDa.

A obtenção de antígenos recombinantes e de anticorpos monoclonais para testes de detecção de anticorpos e antígenos, respectivamente, continua sendo objeto de pesquisa de vários autores[7-20].

Esquistossomose Mansônica

A esquistossomose mansônica representa uma das principais endemias parasitárias no Brasil. A espécie *Schistosoma mansoni* é a responsável pela infecção humana por contato com água doce infestada de cercárias eliminadas por moluscos planorbídeos do gênero *Biomphalaria*. A infecção do caramujo é feita através dos miracídios eliminados naquela água e que foram liberados dos ovos viáveis. O parasito adulto, macho e fêmea acasalados, habita o sistema porta e elimina ovos embrionados, que em parte conseguem atravessar a mucosa intestinal e são excretados nas fezes. Parte dos ovos se perde no processo migratório, se deposita em tecidos, principalmente no fígado, e aí entra em degeneração. A resposta de defesa do hospedeiro, que se inicia já na infecção pelas cercárias, desencadeia intenso processo imune-inflamatório com reação do tipo granulomatosa, responsáveis pela imunopatogenia da esquistossomose.

Alguns ovos podem migrar de forma errática até o canal espinhal, onde também se processam as mesmas reações, determinando formas graves de mielites, paresias e até paraplegia. Na neuroesquistossomose, a análise do líquido cefalorraquidiano pode ser de grande utilidade diagnóstica, principalmente porque a administração precoce de antiinflamatórios minimiza o processo e as conseqüentes lesões. A apresentação clínica clássica da esquistossomose pode ser dividida em duas formas: intestinal e hepatoesplênica, sendo esta última de maior gravidade e morbidade, subdividindo-se em forma hepatoesplênica compensada e descompensada. Como a evolução natural da infecção depende do número de parasitos, é proporcional à quantidade de ovos e intensidade reacional do hospedeiro, costuma ser longo o período até a manifestação grave, sendo muito freqüente o achado de grande número de pacientes assintomáticos nas áreas endêmicas.

O diagnóstico parasitológico, achado dos ovos nas fezes, é eficiente na fase intestinal, principalmente na parasitemia intensa. São utilizados os métodos clássicos de pesquisa de ovos, sedimentação espontânea e o método quantitativo de Kato-Katz. Esses testes serão negativos se a infecção é unissexuada e têm menor eficiência na forma hepatoesplênica, quando já se observam granulomas e fibrose na mucosa intestinal, impedindo que os ovos ganhem o lúmen intestinal.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Na esquistossomose, as principais características imunológicas são a presença de anticorpos IgG e IgM, a resposta de hipersensibilidade imediata e tardia e, como mecanismo de evasão parasitária, a adsorção de proteínas do hospedeiro no tegumento dos vermes.

Os testes imunológicos de pesquisa de anticorpos séricos anti-*Schistosoma* são muito utilizados em nosso meio, embora ainda restritos a Centros de Pesquisa, já que não há reagentes disponíveis no mercado. Todos os métodos imunológicos já foram aplicados para a pesquisa de anticorpos na esquistossomose, com destaque para a imunofluorescência e o teste ELISA. As preparações antigênicas utilizadas são as mais diversas, a partir de cercária, verme adulto e ovo, desde extratos brutos, ou vermes íntegros até purificações e antígeno recombinante 31/32kDa. Quanto às classes de imunoglobulinas, IgG e IgM são excelentes marcadores nas fases aguda e crônica, enquanto IgA apresenta boa sensibilidade na fase aguda. Reações cruzadas com *Ascaris lumbricoides* e *Ancylostoma* podem ser observadas, e estudos de identificação de peptídeos podem ser feitos com *imunoblot*.

O teste de hipersensibilidade tardia com antígenos do verme adulto tem boa eficiência para triagem de pacientes e em levantamentos epidemiológicos. Uma das principais utilizações dos testes imunológicos na esquistossomose mansônica é em estudos epidemiológicos para determinar índices de prevalência ou incidência ou avaliar programas de controle e vigilância epidemiológica. No acompanhamento terapêutico e na evolução do caso, alguns marcadores têm sido propostos, com destaque para a detecção de antígenos em urina ou o desaparecimento de reatividade de anticorpos para alguns dos peptídeos antigênicos. Esses métodos, ainda em desenvolvimento, são de caráter elucidativo e prognóstico, embora também se apliquem ao diagnóstico[30-37].

Hidatidose

A hidatidose humana ocorre na América do Sul, principalmente no Uruguai, na Argentina e no Chile. No Brasil, a região de fronteira com Uruguai e Argentina é de destaque para hidatidose, embora casos isolados sejam detectados em outras áreas. Dentre as espécies de *Echinococcus*, o *E. granulosus* é o de maior importância clínica no Brasil.

O ciclo biológico do *E. granulosus* envolve o cão e outros carnívoros como hospedeiros definitivos, eliminando ovos no meio ambiente, e os ovinos, os bovinos e os suínos são os hospedeiros intermediários. Daí, ser comum a presença do parasito em áreas de pastoreio de gado ovino, onde auxiliando o homem na atividade pastoril temos o cão, que se alimenta de vísceras de ovinos infectados com cistos hidáticos e elimina ovos nas fezes. Por sua vez, o gado no pasto ingere os ovos e dá continuidade ao ciclo. O homem, acidentalmente, ingere ovos do parasito e assim passa a ser hospedeiro da forma larvária. O embrião do *E. granulosus*, após atravessar a mucosa intestinal, pode migrar para todos os tecidos e órgãos, sendo encontrado de preferência no fígado e pulmões e mais raramente nos ossos e cérebro. A evolução clínica é longa e os sintomas dependem do crescimento do cisto e de seus eventuais rompimentos, que podem desencadear reação anafilática

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

devido à elevada concentração de anticorpos IgE que são produzidos. Como a principal intervenção terapêutica é a cirúrgica para retirada do cisto, o seu rompimento, causando disseminação posterior ou choque anafilático imediato, é o principal risco do procedimento. Os exames de imagem são ferramentas obrigatórias para a adequada avaliação clínica do caso, além do diagnóstico.

O cisto de *E. granulosus*, diferente dos cistos de *Taenia*, possui milhares de escólices no interior da vesícula, circundada por uma membrana germinativa ou prolígera, com capacidade de regeneração. Essa característica faz com que o cisto, após rompimento e extravasamento de seu conteúdo, possa disseminar-se formando novos cistos, que irão crescer individualmente.

São características imunológicas da hidatidose: o elevado nível de IgE, que pode desencadear anafilaxia após a ruptura de cistos e liberação maciça de antígenos; anticorpos IgG são produzidos desde o início da infecção; o teste intradérmico de Casoni permite a leitura imediata (IgE) e tardia (resposta celular); tanto os anticorpos quanto a resposta T podem mostrar resultados cruzados com outras helmintíases. Para o diagnóstico da hidatidose são considerados, além dos dados clinicoepidemiológicos, os resultados de exames de imagem (ultra-sonografia, ressonância magnética) e de testes imunológicos para pesquisa de anticorpos séricos.

Como a membrana externa ou anista é pouco imunogênica, a resposta imunológica é dirigida para antígenos do líquido hidático, provavelmente de excreção e secreção, que são liberados durante toda a vida do parasito e em grande quantidade quando do rompimento do cisto. Os principais testes imunológicos utilizados para pesquisa de anticorpos contra antígenos do líquido hidático são o ELISA para triagem e dupla difusão, e a contra-imunoeletroforese ou *imunoblot* para confirmar a especificidade dos peptídeos reativos. Outros métodos têm sido empregados na triagem sorológica: hemaglutinação, fixação do complemento e imunofluorescência indireta. Como os soros podem apresentar anticorpos inespecíficos, o teste ELISA pode ser realizado com a amostra pré-tratada com fosforilcolina para absorção dos anticorpos de reatividade cruzada, aumentando a especificidade do teste.

A confirmação pode ser necessária nos casos em que haja divergência clínica devido à inespecificidade de alguns peptídeos que podem ser reconhecidos cruzadamente por anticorpos anticisticercos de *Taenia* ou anticorpos para outras espécies de *Echinococcus*. Na contra-imunoeletroforese e na dupla difusão, é considerado específico o arco precipitado antiantígeno 5 (DD5), utilizando soro padrão para essa identificação. No *imunoblot*, os peptídeos 16 e 21kDa são muito específicos para a forma hepática, o peptídeo 8kDa é freqüente na forma pulmonar e o 38kDa aparece em ambas as formas. Os peptídeos 8 e 38kDa apresentam menor especificidade, podendo ser reconhecidos por anticorpos de alguns soros de pacientes com cisticercose. O teste intradérmico, reação imediata de Casoni, tem sido utilizado na triagem de população de risco e em estudos epidemiológicos, mas é de pouca utilidade no diagnóstico individual devido à baixa sensibilidade e especificidade. O princípio se baseia na hipersensibilidade imediata, IgE, aos antígenos parasitários e sempre há o risco de uma reação sistêmica adversa tipo

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

anafilática. Também é feita a leitura após 24-72 horas para avaliação da resposta tardia.

Embora os testes imunológicos tenham boa eficiência para o diagnóstico, ainda não há marcadores com boa correlação com a fase clínica e com o prognóstico. A detecção de IgE, IgA ou subclasses de IgG poderá contribuir para melhorar o desempenho dos testes atuais[38-43].

Toxocaríase (Síndrome de Larva *Migrans* Visceral)

A síndrome de larva migrans visceral (LMV) se manifesta pela migração e persistência de larvas vivas, em tecidos de hospedeiros não habituais, impedindo o completo ciclo biológico do parasito. No ser humano, o *Toxocara canis* é o agente mais relacionado com a LMV. Ovos do parasito contaminam o ambiente e, em solo argiloso e condições de umidade e calor, poderão se manter embrionados até a ingestão acidental pelo ser humano. Os cães são o reservatório natural do parasito e desenvolvem o verme adulto com postura de ovos nas fezes. Através da circulação umbilical, o feto canino pode ser infectado e desse modo, em cerca de 28 dias após o nascimento, o cãozinho já estará eliminando ovos.

Utilizando testes imunológicos, tem sido observada maior freqüência de anticorpos anti-*Toxocara* em crianças, sugerindo possível imunidade protetora em adultos. A maioria dos casos passa como assintomática, mas são descritas três formas de apresentação da LMV: visceral, ocular e atípica ou oculta. Esta última se caracteriza por manifestações inespecíficas, como cefaléia, hepatomegalia como aumento dos níveis de gamaglutamiltransferase, astenia e dor abdominal. Na forma oculta é mais rara a eosinofilia intensa, mas há elevados títulos de anticorpos. A forma ocular foi identificada em olhos enucleados com suspeita de retinoblastoma. São observados granulomas retinianos, catarata, ceratite e endoftalmite. Embora o quadro seja grave, pode não haver larvas em outros tecidos e o nível de anticorpos estar muito baixo ou indetectável, dificultando o diagnóstico imunológico. O estudo do humor aquoso para pesquisa direta do parasito e de anticorpos produzidos no local pode auxiliar o clínico.

A toxocaríase visceral é a forma mais estudada e mais exuberante quanto aos sintomas e resposta imunológica do hospedeiro. A forma clássica da LMV apresenta febre, manifestações pulmonares, às vezes semelhantes às alergias respiratórias, hepatomegalia, anemia, leucocitose, intensa eosinofilia (> 20%) e hipergamaglobulinemia. Os casos fatais geralmente estão associados com envolvimento do sistema nervoso, meningoencefalites e polirradiculoneurites ou com resposta anafilática do hospedeiro. O diagnóstico direto pode ser feito em tecidos de biópsia, onde se observam granuloma eosinofílico e o parasito que pode ser identificado morfologicamente ou por meio de técnicas imunológicas de pesquisa de antígenos (imuno-histologia).

Devido às limitações das técnicas diretas e ausência de ovos e vermes nas fezes, a toxocaríase humana é estudada por meio de testes imunológicos para detecção de anticorpos séricos. No passado, vários métodos foram propostos e atualmente o teste ELISA é o mais empregado. Os antígenos usados foram extratos somáticos de verme adulto, de ovos embrionados e

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

de larvas, todos mostrando reatividade cruzada com outros helmintos, destacando-se o *Ascaris lumbricoides*. Como a população estudada, crianças, é portadora de ascaridíase, infecção comum nas regiões de precárias condições sanitárias, os testes utilizando antígenos somáticos requereriam prétratamento dos soros com extratos de *Ascaris* para absorção de anticorpos de reatividade cruzada.

O antígeno mais específico é o obtido por cultivo de larvas em meio de cultura, chamado TES (excreção e secreção). O procedimento de obtenção é tedioso e de rendimento reduzido, indicando a necessidade de produção de recombinantes. A aplicação do *western blot* à amostra de soro de toxocaríase mostrou que os peptídeos 24-32kDa são específicos e imunogênicos, são reconhecidos precocemente, tendendo os últimos a perderem a reatividade após a cura.

Os anticorpos IgG anti-*Toxocara* podem permanecer por longos períodos de tempo, e podem ser detectados em indivíduos já curados. Outros marcadores de infecção aguda, como anticorpos da classe IgE ou a pesquisa de antígenos circulantes, ainda carecem de melhor padronização e avaliação da eficácia. Mesmo assim, o achado de positividade para IgG anti-*Toxocara* em pacientes com sintomas clínicos e outros dados laboratoriais indicativos, tem sido considerado um excelente marcador para confirmar a toxocaríase, especialmente quando é observada intensa reatividade[64-70].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GERAL

1. Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 1996.
2. Male D. Imunologia — Um Resumo Ilustrado. 3. ed. São Paulo: Editora Manole, 1998.
3. Stites DP, Terr AI, Parslow TG. Medical Immunology. Stanford: Appleton & Lange, 1997.

IMUNODIAGNÓSTICO DAS PARASITOSES

Amebíase

4. Aquino JL. Amebíase. In: Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, p.135-143, 1996.
5. Craig CF. The Etiology, Diagnosis and Treatment of Amebiasis. Baltimore: Williams & Wilkins Co., 1994.
6. Sloan LM, Rosenblatt J. Evaluation of an immunoassay for the detection of *Entamoeba histolytica* in stool specimens. Am J Trop Med Hyg 51:180, 1994.

Cisticercose

7. Agapejev S. Epidemiology of neurocysticercosis in Brazil. Rev Inst Med Trop (São Paulo) 38:207-216, 1996.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

8. Bonametti AM, Basile MA, Vaz AJ et al. Índice de positividade da reação imunoenzimática (ELISA) para cisticercose no líquido cefalorraquidiano (LCR) e no soro de pacientes com epilepsia. Rev Inst Med Trop (São Paulo) 34:451-458, 1992.

9. Bueno EC, Vaz AJ, Machado LR, Livramento JA, Mielli SR. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. J Clin Microbiol 38, 2000. no prelo.

10. Choromanski L, Estrada JJ, Kuhn RE. Detection of antigens of larval *Taenia solium* in the cerebrospinal fluid of patients with the use of HPLC and ELISA. J Parasitol 76:69-73, 1990.

11. Costa JM, Ferreira AW, Makino MM et al. Spinal fluid immunoenzymatic assay (ELISA) for neurocysticercosis. Rev Inst Med Trop (São Paulo) 24:337-341, 1982.

12. Machado LR, Nóbrega JPS, Barros NG et al. Computed tomography in neurocysticercosis. Arq Neuropsiquiatria 48:414-418, 1990.

13. Pialarissi CSM, Vaz AJ, Souza AMC et al. Estudo comparativo de testes sorológicos no diagnóstico imunológico da neurocisticercose. Rev Inst Med Trop (São Paulo) 29:367-373, 1987.

14. Pinto PSA, Vaz AJ, Germano PML et al. Performance of the ELISA est for swine cysticercosis using antigens of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. Vet Parasitol, 1999. no prelo.

15. Sotelo J, Guerrero V, Rubio F. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. Arch Intern Med 145:442-445, 1985.

16. Spina-França A, Livramento JA, Machado LR. Cysticercosis of the central nervous system and cerebrospinal fluid. Immunodiagnosis of 1573 patients in 63 years (1929-1962). Arq Neuropsiquiatria 51:16-20, 1993.

17. Tavares Jr AR. Aspectos neuropsiquiátricos da neurocisticercose humana. São Paulo, 1994 (Tese de Doutorado–Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo).

18. Tsang VCW, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). J Infect Dis 159:50-59, 1989.

19. Vaz AJ, Livramento JA. Neurocisticercose. In: Ferreira AW, Ávila SLM, eds. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.177-184, 1996.

20. Vaz AJ, Nunes CM, Piazza RMF et al. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. Am J Trop Med Hyg 57:354-357, 1997.

Doença de Chagas

21. Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L et al. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. J Clin Invest 98:1709-1712, 1996.

22. Ferreira AW, Ávila SLM. Doença de Chagas. In: Ferreira AW, Ávila SLM, editores. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.144-149, 1996.

23. Godsel LM, Tibbetts RS, Olson CL et al. Utility of recombinant flagellar calcium-binding protein for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. J Clin Microbiol 33:2082-2085, 1995.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

24. Krautz GM, Galvão LM, Cançado JR et al. Use of a 24-kilodalton *Trypanosoma cruzi* recombinant protein to monitor cure of human Chagas' disease. J Clin Microbiol 33:2086-2090, 1995.

25. Mendes RP, Hoshino-Shimizu S, Moura da Silva AM et al. Serological diagnosis of Chagas' disease: a potential confirmatory assay using preserved protein antigens of *Trypanosoma cruzi*. J Clin Microbiol 35:1829-1834, 1997.

26. Morgan J, Colley DG, Pinto Dias JC et al. Analysis of anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype specificities by western blot in ser from patients with different forms of Chagas' disease. J Parasitol 84:641-643, 1998.

27. Reed SG. Immunology of *Trypanosoma cruzi* infections. Chem Immunol 70:124-143, 1998.

28. Stolf MAS. Diagnostic tests for Chagas' disease. Serological diagnosis. *Trypanosoma cruzi* antigens for serodiagnosis. In: Wendel S, Brener Z, Camargo ME, et al. Chagas' disease (American Trypanosomiasis). Its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brasil'92 São Paulo, Brasil, p.195-206, 1992.

29. Umezawa ES, Shikanai-Yassuda MA, da Silveira JF et al. *Trypanosoma cruzi*: detection of a circulating antigen in urine of chagasic patients sharing common epitopes with an immunodominant repetite antigen. Exp Parasitol 76:352-357, 1993.

Esquistossomose Mansônica

30. Attallah AM, Ismail H, Masry AS et al. Rapid detection of *Schistosoma mansoni* circulating antigen excreted in urine of infected individuals by using a monoclonal antibody. J Clin Microbiol 37:354-357, 1999.

31. Bergquist NR. Schistosomiais vaccine development: approaches and prospects. Mem Inst Oswaldo Cruz 90:221-227, 1995.

32. Ferrari TC, Moreira PR, Oliveira RC et al. The value of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of schistosomiais mansoni myeloradiculopathy. Trans R Soc Trop Med Hyg 89:496-500, 1995.

33. Ferrari TC. Spinal cord schistosomiais. A report of two cases and review emphasizing clinical aspects. Medicine (Baltimore) 78:176-190, 1999.

34. Hoshino-Shimizu S, Kimura RT, Chieffi PP. Esquistossomose mansônica. In: Ferreira AW, Ávila SLM, eds. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.183-193, 1996.

35. Shaker ZA, Kaddah MA, Hanallah SB et al. Production of monoclonal antibodies against target schistosomal antigen secreted in the urine of *Schistosoma mansoni*-infected patients. (publicação?) 28:1893-1901, 1998.

36. Valli LC, Kanamura HY, da Silva RM et al. Efficacy of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of and serologic distinction between acute and chronic *Schistosoma mansoni* infection. Am J Trop Med Hyg 57:358-362, 1997.

37. Valli LC, Kanamura HY, da Silva RM et al. Schistosomiais mansoni: immunoblot analysis to diagnose and differentiate recent and chronic infection. Am J Trop Med Hyg 61:302-307, 1999.

Hidatidose

38. Gottstein B, Eckert J, Michael AS, Thopmson RG. *Echinococcus* antigen: immunoelectrophoretic and western blot analysis of hidatid cyst fluids. Parasitol Res 73:186-189, 1987.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

39. Ito A. Basic and applied immunology in cestode infections: from *Hymenolepis* to *Taenia* and *Echinococcus*. Int J Parasitol 27:1203-1211, 1997.

40. Jenne L, Kilwinski J, Radloff P et al. Clinical efficacy of and immunologic alterations caused by interferon gamma therapy for alveolar echinococcosis. Clin Infect Dis 26:492-494, 1998.

41. Kharebov A, Nahmias J, El On J. Cellular and humoral immune responses of hydatidosis patients to *Echinococcus granulosus* purified antigens. Am J Trop Med Hyg 57:619-625, 1997.

42. Saraiva PJ. Hidatidose. In: Ferreira AW, Ávila SLM, eds. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.201-207, 1996.

43. Wellinghausen N, Gebert P, Kern P. Interleukin (IL)-4, IL-10 and IL-12 profile in serum of patients with alveolar echinococcosis. Acta Trop 73:165-174, 1999.

Leishmaniose

44. Aviles H, Belli A, Armijos R *et al.* PCR detection of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. J Parasitol 85:181-187, 1999.

45. Badaró R, Reed SG. Leishmaniose. In: Ferreira AW, Ávila SLM, eds. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 150-156, 1996.

46. Badaró R, Benson D, Eulálio MC. RK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. J Infect Dis 173:758-761, 1996.

47. Barral Netto M, Barral A, Brodskyn C et al. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol17:21-28, 1995.

48. Houghton RL, Petrescu M, Benson DR et al. A cloned antigen (recombinant K39) of *Leishmania chagasi* diagnostic for visceral leishmaniais in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. J Infect Dis 177:1339-1344, 1998.

49. Jensen AT, Gasim S, Moller T et al. Humoral and cellular immune responses to synthetic peptides of the *Leishmania donovani* kinetoplast membrane protein-11. Scand J Immunol 48:103-109, 1998.

50. Jensen AT, Gasim S, Moller T et al. Serodiagnosis of *Leishmania donovani* infections: assessment of enzyme-linked immunosornet assays using recombinant L. donovani. Trans R Soc Trop Med Hyg 93:157-160, 1999.

51. Rafati S, Couty Jouve S, Alimohammadian MH et al. Biochemical analysis and immunogenicity of *Leishmania major* amastigote fractions in cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Immunol 110:203-211, 1997.

Toxoplasmose

52. Alexander J, Jebbari H, Bluethmann H et al. Immunological control of *Toxoplasma gondii* and appropriate vaccine design. Curr Top Microbiol Immunol 219: 183-195, 1996.

53. Camargo ME, Silva SM, Leser PG et al. Avidez de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. Rev Inst Med Trop (São Paulo) 33:213-218, 1991.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

54. Camargo ME. Toxoplasmose. In: Ferreira AW, Ávila SLM, eds. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.165-174, 1996.

55. Decoster A, Darcy F, Caron A. Anti p30 IgA antibody as prenatal markers of congenital toxoplasma infection. Clin Exp Immunol 87:310-315, 1992.

56. Hohfeld P, Daffos F, Costa JM. Prenatal diagnosis for congenital toxoplasmosis with a polymerase chain reaction in test on amniotic fluid. N Engl J Med 331:695-699, 1994.

57. Klaren VN, van Doornik CE, Ongkosuwito JV et al. Differences between intraocular and serum antibody responses patients with ocular toxoplasmosis. American J Ophthalmol 126:698-706, 1998.

58. Montoya JG, Parmley S, Liesenfeld O et al. Use of the polymerase chain reaction for diagnosis of ocular toxoplasmosis. Ophthalmology 106:1554-1563, 1999.

59. Muiño JC, Juárez CP, Luna JD et al. The importance of IgG and IgE autoantibodies to retinal antigen, total serum IgE and sCD23 levels in autoimmune and infectious uveitis. J Clin Immunol 19:215-222, 1999.

60. Parmely SF, Goebel FD, Remington JS. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 30:3000-3002, 1992.

61. Remington JS, MacLeod R, Desmont G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO, eds. Infectious diseases of the fetus and new-born infant. 4th ed. Philadelphia, E. Saunders, p.140-267, 1994.

62. Toth T, Sziller I, Papp Z. PCR detection of *Toxoplasma gondii* in human fetal tissues. Methods Mol Biol 92:195-202, 1998.

63. Whittle RM, Wallace GR, Whiston RA et al. Human antiretinal antibodies in toxoplasma retinochoroiditis. Br J Ophthalmol 82:1017-1021, 1998.

TOXOCARÍASE

64. Arias Irigoyen J, Senent Sánchez CJ. Toxocariasis: a cause of hyper IgE and eosinophilia. J Invest Allergol Clin Immunol 5:232-234, 1995.

65. Badley JE, Grieve RB, Bowman D et al. Analysis of *Toxocara canis* larval excretory-secretory antigens: physicochemical, characterization and antibody recognition. J Parasitol 73:593-600, 1987.

66. Benitez del Castillo JM, Herreros G, Guillen JL et al. Bilateral ocular toxocariasis demonstrated by aqueous humor enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Ophtalmol 119:514-516, 1995.

67. Kayes SG. Human toxocariasis and the visceral larva migrans syndrome: correlative immunopathology. Chem Immunol 66:99-124, 1997.

68. Lou ZJ, Wang GX, Yang CI et al. Detection of circulating antigens and antibodies in *Toxocara canis* infection among children in Chengdu, China. J Parasitol 85:252-256, 1999.

69. Moreira Silva SF, Leão ME, Mendonça HF et al. Prevalence of anti-*Toxocara* antibodies in a random sample of inpatients at a children's hospital in Vitória, Espírito Santo, Brazil. Rev Inst Med Trop (São Paulo) 40:259-261, 1998.

70. Perez BA, Jacob CMA. Toxocaríase. In: Ferreira AW, Ávila SLM, eds. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.208-216, 1996.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

71. Arai M, Mizukoshi C, Kubochi F et al. Detection of *Plasmodium falciparum* in human blood by a nested polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 51:617-626, 1994.

72. Chapman A, Vallejo V, Mossie KG et al. Isolation and characterization of species-specific DNA probes from *Taenia solium* and *Taenia saginata* and their use in an egg detection assay. J Clin Microbiol 33:1283-1288, 1995.

73. Chung J-Y, Bahk YY, Huh S et al. A recombinant 10kDa protein of *Taenia solium* metacestodes specific to active neurocysticercosis. J Infect Dis 180:1307-1315, 1999.

74. Fischer C, Nosratian R, Habtemichael N et al. Preparation and sequence analysis of *Taenia crassiceps* metacestode recombinant antigens with potential for specific immunodiagnosis of human cerebral cysticercosis. Trop Med Parasitol 45:324-328, 1994.

75. Gervokian G, Manoutcharian K, Larralde C et al. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. Immunol Letters 49:185-189, 1996.

76. Hancock K, Mohamed YB, Haichou X et al. A recombinant protein from *Schistosoma mansoni* useful for the detection of *S. mansoni* and *S. haematobium* antibodies. J Parasitol 83:612-618, 1997.

77. Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase chain reaction in test of amniotic fluid. N Engl J Med 331:695-699, 1994.

78. Hubert K, Andriantsimahavandy A, Michault A et al. Serological diagnosis of human cysticercosis by use of recombinant antigens from *Taenia solium* cysticerci. Clin Diagn Immunol 6:479-482, 1999.

79. Kaplan RM, Dame JB, Reddy GR et al. The prevalence of *Fasciola hepatica* in its snail intermediate host determined by DNA probe assay. Int J Parasitol 27:1585-1593, 1997.

80. McVie A, Ersfeld K, Rogan MT et al. Expression and immunological characterization of *Echinococcus granulosus* recombinant antigen B for IgG4 subclass detection in human cystic echinococcosis. Acta Trop 67:19-35, 1997.

81. Ramzy RMR, Helmy H, Faris R et al. Evaluation of a recombinant antigen-based antibody assay for diagnosis of brancoftian filariais in Egypt. Ann Trop Med Parasitol 89:443-446, 1995.

82. Ranachandran S, Thompson RW, Gam AA et al. Recombinant cDNA clones for immunodiagnosis of strongiloidiasis. J Infect Dis 177:196-203, 1998.

83. Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. Intl J Parasitol 27:1135-1145, 1997.

84. Skeiky YA, Badaró R, Reed SG. A recombinant leishmania antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce Interleukin 12. J Exp Med 182:1527-1537, 1995.

85. Sturn NR, Dgrave W, Morel C et al. Sensitive detection and shizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. Mol Biochem Parasitol 33:205-214, 1989.

© *Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.*

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte



SEÇÃO 7

Biologia Molecular

© Direitos reservados à EDITORA ATHE

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CAPÍTULO 30



Métodos Moleculares no Diagnóstico das Parasitoses Humanas

Edmundo Carlos Grisard
Mário Steindel

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A necessidade de métodos sensíveis e específicos para o diagnóstico das diferentes doenças parasitárias humanas tem constituído um grande desafio para a comunidade científica. A procura por métodos capazes de detectar com precisão uma infecção, em qualquer uma das suas diferentes fases, tem levado inúmeros grupos a desenvolver e/ou aprimorar técnicas parasitológicas, sorológicas ou moleculares para esse fim.

Aliado à especificidade dos métodos parasitológicos, o advento dos métodos sorológicos, os quais evidenciam a presença de parasito por vias indiretas, elevou sobremaneira a sensibilidade dos métodos diagnósticos quando utilizados em conjunto com os métodos parasitológicos. Dentre as diferentes metodologias sorológicas amplamente difundidas, podemos citar a reação de imunofluorescência (direta e indireta), o ELISA e o *western blot*, que permitiram, na maioria dos casos, um diagnóstico preciso, não-invasivo, apresentando valores expressivos de sensibilidade e especificidade.

Entretanto, a necessidade cada vez mais urgente da detecção precoce e específica de uma infecção encontrou dificuldades nesses métodos devido à ocorrência de reatividade cruzada entre espécies antigenicamente muito próximas, como, por exemplo, o *Trypanosoma cruzi* e o *T. rangeli* ou ainda as diferentes espécies do gênero *Leishmania*.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

A recente adoção de tecnologias de análise de ácidos nucléicos na detecção e caracterização de parasitos tem apresentado resultados promissores. As técnicas apresentam-se reprodutíveis, muito sensíveis e de alta especificidade, sendo as seqüências-alvo no DNA conservadas durante as distintas fases do ciclo desses parasitos. Além disso, seqüências de RNA, principalmente os RNA mensageiros (mRNA), também podem ser utilizadas em diagnóstico molecular. Atualmente são utilizados inúmeros métodos de Biologia Molecular na detecção, assim como na caracterização e na diferenciação específica de diferentes parasitos. Dentre outros, podemos citar os trabalhos de detecção e diferenciação específica entre o *T. cruzi* e o *T. rangeli* utilizando sondas de DNA total[13], sondas de DNA nuclear e sondas de kDNA[10,32]; amplificação via reação em cadeia da polimerase (PCR) de fragmentos distintos de regiões constantes e variáveis do DNA nuclear e cinetoplástico[1,4,7,12,16,22,25,34,38], utilizando iniciadores aleatórios (AP-PCR) para obtenção de perfis de DNA polimórfico (RAPD), permitindo comparação inter e intra-específica[32,33], iniciadores múltiplos em uma mesma reação (*multiplex*-PCR)[14] ou ainda duas reações específicas subseqüentes, sendo o segundo par de iniciadores dirigidos à seqüência amplificada pelo primeiro par (*nested*-PCR)[23].

Dentre todos estes métodos e suas variantes, destacamos a reação em cadeia da polimerase, a qual será tratada em detalhes no presente capítulo.

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Ao final da década de 1980, Saiki e cols.[28] e Mullis e Faloona[21] desenvolveram simultaneamente o que tem sido a ferramenta primordial de estudos de Biologia Molecular nos últimos anos, a reação em cadeia da polimerase ou PCR (*polymerase chain reaction*). O desenvolvimento da PCR foi possível graças à descoberta de uma enzima termoestável com atividade de polimerase (*Taq* DNA polimerase) isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, a qual promove a síntese de DNA *in vitro* no sentido 5'-3' à semelhança do que ocorre *in vivo*.

A PCR apresenta-se como um método de extrema sensibilidade, permitindo a geração exponencial de cópias de seqüências específicas a partir de um DNA molde, por meio de uma síntese enzimática *in vitro*. Resumidamente, pela alternância de ciclos de temperatura da reação promove-se a desnaturação da fita molde, ligação dos iniciadores e extensão das novas cadeias de DNA pela ação da *Taq* DNA polimerase, resultando em cópias exatas do segmento-alvo[21,28]. Dada a sua grande capacidade de síntese, a PCR é capaz de amplificar até 4×10^6 vezes uma dada seqüência de DNA molde de dupla fita em 25 ciclos de reação[15,39]. A PCR apresenta uma taxa calculada de erro de incorporação de cerca de 2×10^{-4}.

Após sua rápida difusão no meio científico, a PCR tem sido amplamente utilizada na detecção e caracterização de agentes etiológicos de importantes parasitoses humanas, como, por exemplo, *T. cruzi*[20,35], *Leishmania* spp.[13,24], *Plasmodium* spp.[40], *Wuchereria bancrofti*[41], *Onchocerca volvulus*[9], *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Taenia* spp., *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma mansoni* e *Fasciola hepatica*[5,6,37].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Basicamente a PCR utiliza cinco componentes para cada reação de amplificação, que seguem: o DNA molde, deoxinucleotídeos trifosfatados, uma solução tampão contendo KCl, $MgCl_2$ e Tris-HCl em pH e concentrações distintas, a enzima *Taq* DNA polimerase e os iniciadores. A qualidade e a concentração de cada componente da reação têm influência direta no funcionamento da reação, na qualidade dos resultados, assim como na sensibilidade e especificidade da mesma. Em função disso, passamos a descrever cada um dos componentes da reação, detalhando desde a preparação até sua utilização.

Extração de DNA

Existem vários métodos de extração de DNA e RNA descritos na literatura. Para o diagnóstico de parasitoses humanas, os ácidos nucléicos podem ser extraídos de diferentes tecidos, como sangue, pele, músculo, entre outros. O método tradicional do fenol/clorofórmio[29] é ainda o método mais utilizado, sendo o que apresenta maior rendimento. Entretanto, são inúmeros os *kits* comerciais para a realização desse processo, muitos deles não utilizando solventes orgânicos que podem ser transportados e estocados à temperatura ambiente. Além disso, estes *kits* diminuem em muito o tempo de extração, não incorrendo substancialmente no aumento do preço da técnica. Além desses, técnicas diferenciadas utilizando detergentes não-iônicos, como Tween®, Triton® e Nonidet® (atualmente chamado de Igepal®), também são descritas.

Ao extrair-se DNA total de determinado tecido com o intuito de pesquisar a presença de DNA de um agente etiológico em particular, independente do método de extração e do tecido, deve-se considerar o excesso de DNA do hospedeiro, o que pode, por vezes, levar a uma inibição da reação de amplificação. Dentre os possíveis inibidores, podemos citar, por exemplo, a presença excessiva de proteínas e, em particular, a hemoglobina. Da mesma forma, reagentes utilizados nos processos extrativos podem levar a uma inibição da reação, como, por exemplo, resíduos de formol e fenol. Usualmente biópsias de tecidos são acondicionadas em solução de formol a 10% para a prática histológica. Para os diagnósticos moleculares parte da amostra coletada deve ser preservada em etanol a 70%, o qual sabidamente não tem qualquer influência na reação de amplificação.

Dosagem de DNA

A pureza e a quantidade de DNA a ser utilizada em uma reação de amplificação também devem ser consideradas. A correta utilização de processos de extração descritos na literatura usualmente assegura um DNA de boa qualidade para a reação de amplificação. A dosagem de DNA, assim como a presença de certos contaminantes, pode ser facilmente realizada por espectrofotometria. Na ausência deste equipamento, a dosagem de DNA extraído pode ser realizada de maneira mais fácil e menos custosa por meio de eletroforese em géis de agarose, comparando-se com padrões conheci-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

dos. Entretanto, esse método não revela a presença de contaminantes. A dosagem de DNA faz-se necessária, pois quantidades muito elevadas de DNA também podem levar a uma inibição da reação de amplificação.

INICIADORES

Os iniciadores, em inglês *primers,* são pequenos oligonucleotídeos com tamanho variando entre 10 e 30 bases, que possuem seqüência homóloga às porções terminais de segmentos de DNA-alvo que se deseja amplificar. Para tanto, o desenho de um par de iniciadores necessário à amplificação específica de DNA de dupla fita é usualmente realizado a partir de uma seqüência conhecida, devendo cada um dos iniciadores se complementar a cada uma das fitas do DNA molde. O tamanho e o conteúdo de bases de um iniciador estão diretamente relacionados à temperatura de ligação deste à fita molde e, por conseqüência, à especificidade da reação. DNA de dupla fita apresenta ligações entre bases que podem ser realizadas por duas (A = T) ou três (G ≡ C) pontes de hidrogênio. Assim, quanto maior o conteúdo de G ≡ C em uma cadeia de DNA, maior será a energia necessária à sua desnaturação, ou seja, maior será a temperatura necessária à separação das duas fitas da cadeia. Essa temperatura necessária para romper a ligação intramolecular chama-se temperatura de desnaturação. A subseqüente ligação entre um iniciador e a fita molde homóloga (*annealing*) é dependente do conteúdo de bases G/C desta seqüência, o que determina a temperatura de ligação (*melting temperature* ou T_m). Assim, a temperatura de ligação está diretamente relacionada à especificidade da reação, também chamada estringência.

A T_m ideal de uma reação é aquela que permite a ligação específica do iniciador somente à sua seqüência complementar na fita molde. Ao se alterar a temperatura de ligação altera-se a estringência da reação. Desta forma, torna-se clara a necessidade de balancear a T_m de ambos os iniciadores, uma vez que estes deverão ligar-se à fita molde em uma mesma temperatura durante os ciclos da reação. A diminuição da temperatura de ligação e a utilização de iniciadores de pequeno tamanho são o princípio do RAPD (*random amplified polymorphic* DNA), cujo resultado revela um padrão de variabilidade do DNA genômico de um organismo, tendo sido amplamente utilizado na caracterização de cepas de parasitos[32,33]. Ao desenharem-se novos iniciadores, deve-se ainda atentar para a possibilidade de ligações intramoleculares por dobramento de cadeia (*hairpin*) e intermoleculares entre dois iniciadores (*dimers*). *Hairpins* são formados quando um mesmo iniciador possui seqüências complementares ricas em G ≡ C, o que possibilita o dobramento da cadeia em função da alta força de ligação entre essas bases impossibilitando a ligação do iniciador com a fita molde, e, por conseqüência, a falha da PCR. Os chamados dímeros são ligações entre os dois iniciadores, as quais podem ser desastrosas se ocorrem entre as suas extremidades 3', impossibilitando a ligação às respectivas fitas moldes. Dímeros formados pela ligação entre as extremidades 5' dos iniciadores usualmente não são um impedimento à PCR, podendo, entretanto, requerer o uso de maior concentração dos iniciadores.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Os iniciadores podem ser adquiridos de empresas especializadas, nacionais e internacionais, por um custo de cerca de US$1.60 por base. Essas empresas usualmente enviam os iniciadores liofilizados, na quantidade desejada e já com a T_m calculada. Embora as concentrações dos iniciadores deva ser ajustada a cada reação, as concentrações descritas na literatura para uma PCR específica giram em torno de 1 a 2,5pmoles/tubo de reação.

Deoxinucleotídeos Trifosfatados

Os laboratórios de pesquisa e clínicos utilizam atualmente deoxinucleotídeos trifosfatados disponíveis no mercado. Os chamados dNTP (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) podem ser adquiridos separadamente ou em *kits* contendo os quatro nucleotídeos. Cabe salientar que em cada reação devem ser utilizadas concentrações iguais de cada um dos nucleotídeos com o intuito de minimizar a possibilidade de incorporações errôneas. A cada ciclo da reação de amplificação, a hidroxila (OH), presente na extremidade 3' da nova fita de DNA que está sendo sintetizada, cliva dois fosfatos do dNTP que está sendo incorporado pela *Taq* DNA polimerase na nova cadeia de DNA. Assim, a cada nucleotídeo monofosfatado incorporado é liberado um pirofosfato.

Tampão

Dentre os distintos componentes da PCR, a composição e o pH do tampão podem influir de maneira significativa na sensibilidade da reação. Os tampões utilizados na PCR são geralmente compostos por três reagentes principais: o cloreto de magnésio ($MgCl_2$), o cloreto de potássio (KCl) e o Tris-HCl. Alguns protocolos ainda utilizam outros reagentes, como albumina bovina (BSA), gelatina, detergentes não-iônicos ou dimetilsulfóxido (DMSO), com o objetivo de propiciar melhor estabilidade à *Taq* DNA polimerase, ainda que suas eficácias sejam discutidas[15].

Usualmente, os fabricantes da *Taq* DNA polimerase fornecem junto com a enzima um tampão próprio. Entretanto, as concentrações de cada um dos reagentes nesses tampões pode não ser a ideal para a reação de amplificação. Neste sentido, existem *kits* comerciais que auxiliam na definição da concentração de cada reagente, assim como do pH. Uma tabela apresentada no *kit* Opti-Prime®, fabricado pela empresa americana Stratagene (La Jolla, CA — USA), auxilia a preparar 12 diferentes tampões, com três diferentes pH, que podem ser utilizados para a definição do tampão ideal.

Uma vez preparados os tampões, deve-se realizar uma reação utilizando-se em cada tubo de reação um tampão diferente, porém todos os demais componentes da reação, incluindo-se o DNA molde, permanecem os mesmos.

Taq DNA Polimerase

A *Taq* apresenta uma capacidade de incorporação de cerca de 35 a 100nt/s, o que equivale a uma velocidade de 2Kb/min. Desta forma, obser-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

va-se que a chamada temperatura de extensão é usualmente a mesma em diferentes protocolos (72°C), apesar da enzima apresentar um amplo espectro de atividade em relação à temperatura[15]. Assim como o descrito para os nucleotídeos, são vários os fabricantes da enzima que a oferecem em concentrações variadas; seu transporte e estocagem devem ser realizados em temperaturas abaixo de zero, especialmente em gelo seco, e sua manutenção feita em *freezer* a -20°C ou -70°C.

Cabe salientar que, em algumas enzimas, a adição de glicerol pelo fabricante impede sua congelação, não sendo assim válida esta observação como controle do transporte.

Laboratórios de Biologia Molecular bem aparelhados podem produzir sua própria enzima. Entretanto, dois pontos básicos devem ser considerados: a presença de DNA residual da bactéria transformante e a presença de outros contaminantes da PCR, como, por exemplo, a albumina utilizada como preservativo da *Taq* DNA polimerase, os quais podem interferir na reação e na eletroforese corada pela prata, respectivamente.

Termocicladores

Existem atualmente inúmeros fabricantes de termocicladores (máquinas de PCR) que são apresentados em diferentes modelos e opções a fim de adequarem-se às mais variadas necessidades. Dentre as principais variáveis abordadas pelos fabricantes, no intuito de aprimorar a sensibilidade e a reprodutibilidade da reação, podemos citar a velocidade de alteração entre diferentes temperaturas, o número, a forma e a espessura dos tubos plásticos e a necessidade de utilizar-se óleo mineral para evitar a evaporação dos reagentes. Nesse sentido, máquinas com a tampa aquecida realizam um aquecimento do tubo por completo, evitando o uso de óleo mineral.

Reação

Em função da possibilidade de ocorrência de contaminação, os procedimentos de extração de DNA, preparação da PCR, amplificação e visualização dos resultados devem ser realizados em ambientes distintos e de maneira linear. Estes procedimentos e cuidados são discutidos adiante em *Cuidados com contaminações*.

Basicamente, a reação de PCR consiste na preparação correta dos componentes, o chamado *mix* ou *master mix*, nas concentrações predefinidas de cada reagente e na posterior adição do DNA molde aos tubos. Se necessária, a adição de óleo mineral pode ser realizada nesse ponto a fim de evitar evaporação e, por conseqüência, alteração da concentração dos componentes. São descritas na literatura quantidades diferentes de *mix*, usualmente entre 10 e 100µl.

O programa de amplificação, anteriormente inserido no termociclador, deve contemplar as temperaturas e os tempos de desnaturação, a ligação e a extensão para cada iniciador e propósito. Como um exemplo prático, a Tabela

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

30.1 apresenta os tempos e temperaturas para a amplificação do minicírculo do kDNA de *T. cruzi* e *T. rangeli*.

Nesse caso, o conteúdo dos iniciadores utilizados (S-35 e S-36)[34] determinou a temperatura de 55°C como a ótima para a ligação iniciador/DNA molde. Assim como um baixo número de ciclos pode levar a uma reação frustrada, ciclos demasiados podem incorrer em erros de amplificação. O número de ciclos de uma reação de PCR guarda uma relação inversa entre o número de cópias do gene ou seqüência-alvo e o número de ciclos da reação. Desta forma, também o número de ciclos da PCR deve ser padronizado antes de seu uso prático.

Usualmente os termocicladores são programados para resfriar os tubos de reação após o último ciclo de reação com o intuito de evitar a formação de estruturas secundárias ou heterodúplex. A cada conjunto de reação deve-se adicionar dois controles básicos: o positivo, que consiste em utilizar o DNA puro do patógeno a ser pesquisado, devendo revelar a banda específica do parasito, e o negativo, o qual consiste em todos os componentes da reação à exceção do DNA molde, que não deve revelar qualquer produto de amplificação.

VISUALIZAÇÃO DOS RESULTADOS

A visualização do resultado de uma PCR é realizada através da eletroforese dos produtos de amplificação em géis de poliacrilamida ou agarose. Este procedimento permite a separação de produtos de amplificação pelo seu tamanho (em pares ou *kilobases*) utilizando-se um campo elétrico. A determinação do tamanho dos produtos de amplificação é realizada através da comparação com padrões de tamanho molecular conhecidos. Estes padrões são usualmente o DNA total de bacteriófagos ou plasmídeos digeridos com enzimas de restrição.

Na eletroforese em gel de agarose os produtos são corados pelo brometo de etídio e a revelação é feita por exposição à luz ultravioleta (Fig. 30.1).

Este método é simples e de baixo custo; entretanto, o brometo de etídio é altamente cancerígeno. Os géis são geralmente preparados na concentração de 1% a 2% e o seu poder de resolução permite a detecção de quantidades de DNA da ordem de 0,01μg[29]. Comparativamente, a eletroforese

Tabela 30.1
Número de Ciclos, Temperaturas e Tempos/Temperatura da PCR para Amplificação do Minicírculo do kDNA de *Trypanosoma cruzi* e *T. rangeli* Utilizando os Iniciadores S-35 e S-36[34]

Ciclo	*Temperatura*	*Tempo (Min.)*
1	94°C	5
2	55°C	1
3	72°C	1
4	Repetir 29 vezes	
5	72°C	5

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

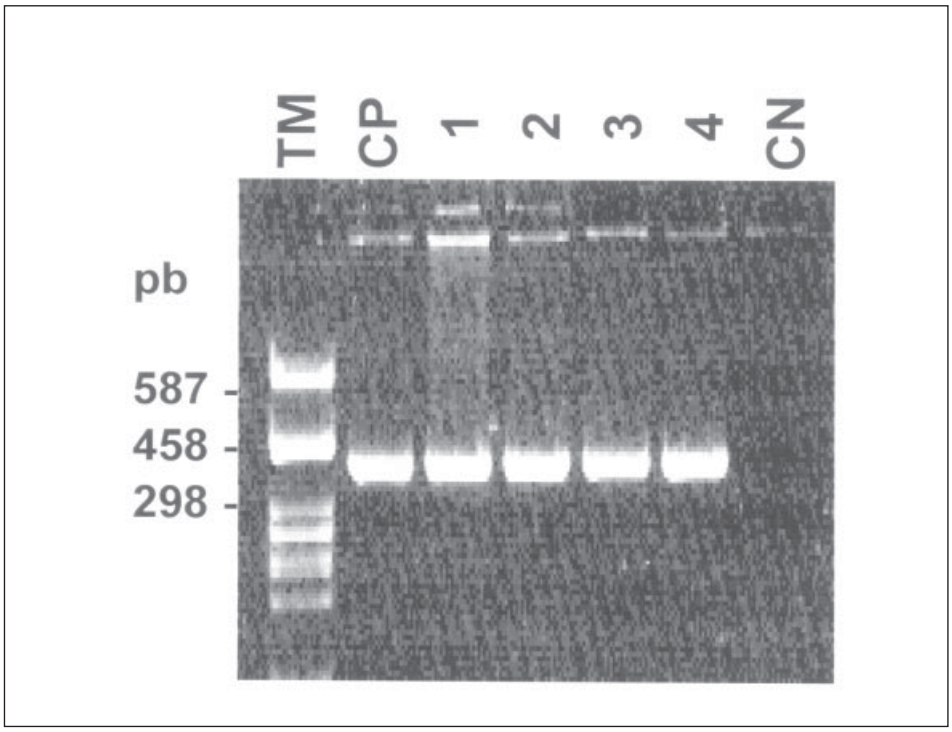


Fig. 30.1 — *Eletroforese em gel de agarose a 1%, corado pelo brometo de etídio, mostrando os produtos de amplificação via PCR a partir de biópsias de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar. TM = Padrão de tamanho molecular; CP = Controle positivo (DNA genômico de* L. amazonensis*), 1 a 4 = Amostras de pacientes; CN = Controle negativo (sem adição de DNA).*

realizada em géis de poliacrilamida e a coloração dos produtos pela prata é cerca de 50 vezes mais sensível que a agarose (Fig. 30.2)[31].

Entretanto, esta técnica apresenta um custo mais elevado. Assim como os géis de agarose, os géis de poliacrilamida também podem ser corados pelo brometo de etídio.

APLICAÇÕES PRÁTICAS

A utilização da PCR no intuito de detectar a infecção de reservatórios vetores, assim como a infecção humana por diferentes parasitos, tem sido amplamente descrita na literatura. O primeiro registro do uso da PCR na detecção do *T. cruzi* em fezes de triatomíneos foi descrito em 1989. Foi utilizada como alvo uma seqüência de 195 picogramas (pb) do DNA nuclear do protozoário, não apresentando reatividade cruzada com o DNA humano, de camundongo, de *Leishmania* spp. e de tripanossomas africanos. Entretanto, a reação também foi negativa quando utilizada na pesquisa de DNA do *T. cruzi* no sangue de pacientes chagásicos crônicos[20].

Outros autores igualmente detectaram o DNA de *T. cruzi* em amostras de fezes secas de triatomíneos experimentalmente infectados, obtendo maior taxa de positividade via PCR do que através do exame direto ao microscópio[27]. Iniciadores para a amplificação específica do gene do miniéxon

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

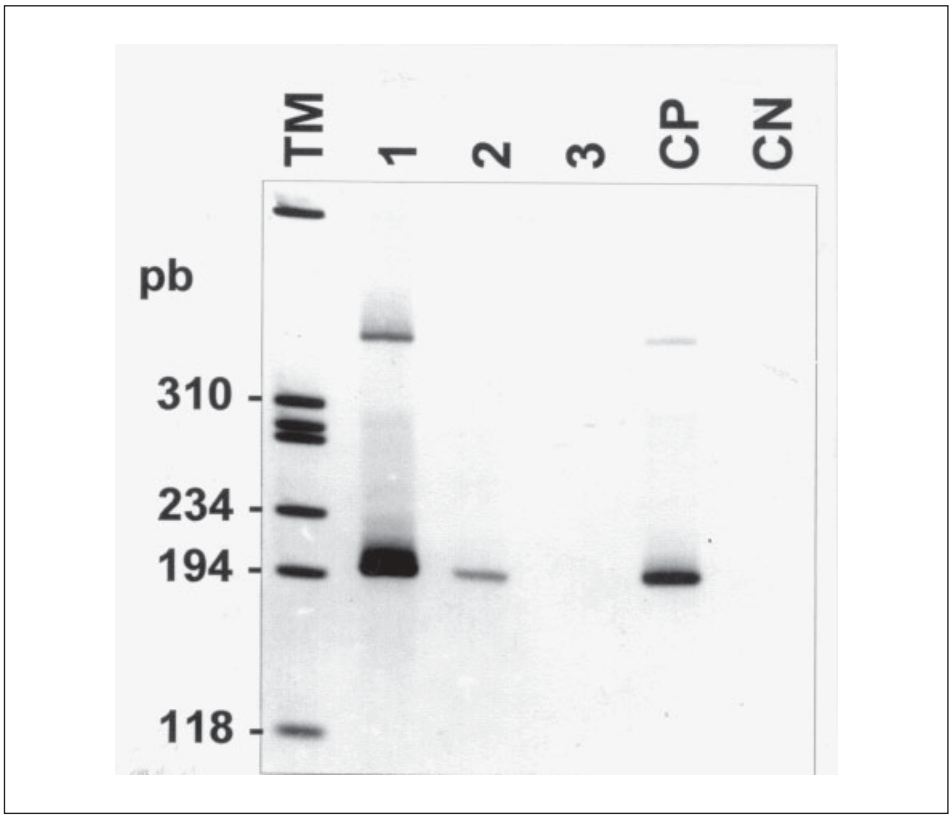


Fig. 30.2 — *Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, corado pela prata, mostrando os produtos de amplificação via PCR de amostras de fezes de triatomíneos infectados com o* Trypanosoma cruzi*; TM = Marcador de tamanho molecular; 1 e 2 = Duas concentrações de DNA extraído de fezes; 3 = Fezes de triatomíneos não-infectados; CP = Controle positivo da reação (DNA genômico de* T. cruzi*); CN = Controle negativo da reação (sem adição de DNA).*

permitiram diferenciar o *T. cruzi* do *T. rangeli* pelo tamanho dos produtos de amplificação de cerca de 582pb e 858pb, respectivamente[22]. Utilizando um outro par de iniciadores dirigidos à região conservada deste mesmo gene observaram-se produtos de amplificação de tamanhos distintos para as 10 diferentes espécies do gênero *Leishmania*, assim como para quatro espécies do gênero *Trypanosoma* testadas[25]. Outros iniciadores *T. rangeli* específicos desenvolvidos permitiram diferenciar o parasito de *T. cruzi* de maneira inequívoca em triatomíneos; entretanto, a presença de excesso de DNA do hospedeiro inibe a reação de PCR[12].

Amostras de sangue de 61 pacientes, diagnosticados sorologicamente como positivos para *T. cruzi* (RIFI, ELISA e HA), foram analisadas através de PCR para a pesquisa de seqüências conservadas dos minicírculos do kDNA do parasito. Do total de pacientes, 55 revelaram-se positivos por PCR, resultando em sensibilidade de 90% quando comparado com os exames sorológicos[2].

Utilizando a mesma região-alvo do kDNA, foi possível a detecção de DNA de *Leishmania* spp. em biópsias de pacientes com lesões cutâneas, não havendo reatividade cruzada com DNA do *T. cruzi*[25]. Entretanto, a presença de excesso de DNA do hospedeiro promovia uma inibição de 10 a

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

100 vezes na sensibilidade de detecção do DNA do parasito. Da mesma forma, utilizando-se como fonte de DNA *imprints* realizados em papel-filtro ou de nitrocelulose, foi permitido detectar a presença e identificar especificamente o agente causal de leishmaniose tegumentar americana[13,19].

GENES DE INTERESSE

Genes multicópias que não apresentam homologia com o DNA do hospedeiro são seqüências-alvo de grande interesse para fins de diagnóstico e/ou caracterização de parasitos. Dentre essas, poderíamos citar os minicírculos de kDNA[38] e gene do miniéxon[7,12,13] para os tripanossomatídeos, DNA de microssatélites e RNA mensageiros (mRNA).

CUIDADOS COM AS CONTAMINAÇÕES

Contaminações de reações de PCR são causadas por produtos de amplificações prévias. Nesse sentido, a estrita separação de ambientes, reagentes e equipamentos utilizados nas fases de extração de DNA, preparação da reação e na visualização dos resultados é essencial e eficaz. A simples utilização deste procedimento de maneira linear, ou seja, sempre no sentido único extração-eletroforese, é por si só eficiente na prevenção de contaminação.

Apesar disso, existem protocolos que permitem realizar a descontaminação de reações de PCR ou de ambientes. Dentre esses podemos citar os protocolos da uracil DNA glicosilase (UDG)[18] e a utilização dos derivados do isopsoralen como um dos componentes da reação[3]. Obviamente, esses protocolos, além de aumentarem o custo da reação, podem levar a um relaxamento nos cuidados básicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inquestionavelmente, a PCR específica, bem como algumas de suas variantes, tem apresentado resultados interessantes não somente na detecção mas também na caracterização inter e intra-específica de diferentes parasitos humanos e animais. Atualmente o preço de uma reação tem sido estimado entre U$6.00[7], incluindo a eletroforese, e U$17.54 para uma reação completa seguida de clonagem e seqüenciamento direto do produto de PCR[15].

Na atualidade, a PCR apresenta-se como uma ferramenta diagnóstica acessível, sensível e reprodutível com inúmeras vantagens na detecção de DNA de agentes patogênicos em diferentes tecidos. A padronização da técnica, levando-se em conta aspectos intrínsecos da reação (inibição e contaminação por produtos de amplificação), e fatores inerentes ao parasito e à infecção (parasitemia e localização) podem levar a resultados falso-negativos da PCR ou a resultados discordantes de outras técnicas. Todos estes fatores devem serem considerados quando da padronização, execução ou aplicação da técnica da PCR.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ávila HA, Pereira JB, Thieman O et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by Polymerase Chain Reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: Comparison with serology and xenodiagnosis. J Clin Microbiol 31:2421-2426, 1991.
2. Britto C, Cardoso MA, Monteiro Vanni CM et al. Polymerase chain reaction of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. Parasitology 110:241-247, 1995.
3. Cimino GD, Metchette KC, Tessman JW et al. Post-PCR sterilization: A method to control carryover contamination for the polymerase chain reaction. Nucleic Acid Res 19:99-107, 1991.
4. Dorn PL, Selgean S, Guillhot M. Simplified method for preservation and polymerase chain reaction-amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood. Mem Inst Oswaldo Cruz 92:253-255, 1997.
5. Eisenstein BI. The polymerase chain reaction — A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. N Engl J Med 322:178-183, 1990.
6. Emmanuel PJ. Polymerase chain reaction from bench to bedside. J Fla Med Assoc 80:627-630, 1993.
7. Fernandes AJ, Grisard EC, Vidigal PG et al. A reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico da doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop 30 (Supl.1):65-67, 1997.
8. Fernandes O, Sturm N, Derré R et al. A. The mini-exon gene: A genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 95:129-133, 1998.
9. Fischer P, Rubaale T, Meredith SEO et al. Sensivity of a polymerase chain reaction-based assay to detect *Onchocerca volvulus* DNA in skin biopsies. Parasitol Res 82:395-401, 1996.
10. Gonzales A, Prediger E, Huecas ME et al. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: it's use in a high-sensitivity parasite detection assay. Proc Natl Acad Sci USA 81:3356-3360, 1984.
11. Greig S, Ashall F. Detection of South American trypanosomes in insects using total parasite DNA probes. Parasitology Today 3:375-376, 1987.
12. Grisard EC, Campbell DA, Romanha AJ. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. Parasitology 118:375-382, 1999.
13. Grisard EC, Steindel M, Shaw JJ et al. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. Acta Tropica 74:89-93, 1999.
14. Harris E, Kropp G, Belli A et al. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World leishmania complexes. J Clin Microbiol 36:1989-1995, 1998.
15. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ et al. eds. PCR Protocols: A guide to methods and applications. San Diego: Academic Press Inc., 1990.
16. Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE et al. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. J Clin Microbiol 34:1171-1175, 1996.
17. Lewin B, ed. Genes VI. Oxford: Oxford University Press,1998.
18. Longo MC, Berninger S, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosilase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. Gene 93:125-128, 1990.
19. Marques MJ, Volpini AC, Grisard EC et al. Análise comparativa do diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana por PCR, usando como fonte de DNA do parasito bióp-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

sias e imprint das biópsias em papel de filtro e de nitrocelulose. Rev Soc Bras Med Trop 31(Suppl. 3):79-81, 1998.

20. Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 27:1477-1482 1989.

21. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzimol 155:335-350, 1987.

22. Murthy VK, Dibbern KM, Campbell DA. PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. Mol Cell Probes 6:237-243, 1992.

23. Ochs DE, Hnilica VS, Moser DR et al. Postmortem diagnosis of authocthonous acute chagasic myocarditis by polimerase chain reaction amplification of species-specific DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg 54:526-529, 1996.

24. Passos VM, Fernandes O, Lacerda PA et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the most predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, southeast Brazil. Acta Tropica 72:251-258, 1999.

25. Ramos A, Maslov DA, Fernandes O et al. Detection and identification of human pathogenic *Leishmania* and *Trypanosoma* species by hybridization of PCR-amplified mini-exon repeats. Exp Parasitol 82:242-250, 1996.

26. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. Exp Parasitol 71:267-275, 1990.

27. Russomando G, Rojas De Arias A, Almiron M et al. *Trypanosoma cruzi*: P.C.R.-based detection in dried feces of *Triatoma infestans*. Exp Parasitol 83:62-66, 1996.

28. Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al. Enzymatic amplification of b-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230:1350-1354, 1985.

29. Sambrook J, Fritch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, v. 3, 1989.

30. Sanchez DO, Madrid R, Engel JC et al. Rapid identification of *Trypanosoma cruzi* isolates by "dot-spot" hybridization. Febs 168:139-142, 1984.

31. Santos FR, Pena SDJ, Epplen JT. Genetic and population study of an Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism. Human Genetics 90:655-656, 1993.

32. Steindel M, Dias Neto E, Menezes CLP et al. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. Mol Biochem Parasitol 60:71-80, 1993.

33. Steindel M, Dias Neto E, Ribeiro-Rodrigues R et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoezyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. J Euk Microbiol 41:261-267, 1994.

34. Sturm NR, Degrave W, Morel C et al. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: Use in diagnosis of Chagas' disease. Mol Biochem Parasitol 33:205-214, 1989.

35. Vago AR, Macedo AM, Adad SJ et al. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. Lancet 348:891-892, 1996.

36. Vallejo GA, Guhl F, Chiari E et al. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. Acta Tropica 72:203-212, 1990.

37. Weiss JB. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. Clin Microbiol Reviews 8:113-130, 1995.

38. Wincker P, Telleria J, Bosseno MF et al. PCR-Based diagnosis for Chagas' disease in bolivian children living in an endemic active transmission area: Comparison with

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

conventional serological and parasitological diagnosis. Mem Inst Oswaldo Cruz 91(Suppl):297, 1996.

39. Zaha A, ed. Biologia Molecular Básica. Porto Alegre (RS): Editora Mercado Aberto, 1996.

40. Zalis MG, Ferreira-Da-Cruz MF, Balthazar-Guedes et al. Malaria diagnosis: Standardization of a polymerase chain reaction for the detection of *Plasmodium falciparum* parasites in individuals with low-grade parasitemia. Parasitol Res 82:612-616, 1996.

41. Zhong M, Mcarthy J, Bierwert L et al. A polymerase chain reaction assay for detection of the parasite *Wuchereria bancrofti* in human blood samples. Am J Trop Med Hyg 54:357-363, 1996.

© *Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.*

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte



SEÇÃO 8

Identificação Histológica

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Capítulo 31



Técnicas de Rotina em Histologia

Emílio Antonio Jeckel-Neto

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A observação de células e tecidos ao microscópio óptico traz consigo alguns problemas fundamentais que exigem que o material seja processado antes de ser examinado: a) o material deve ser preservado de tal maneira que o seu aspecto morfológico seja o mais semelhante possível ao material *in vivo*. Em algumas técnicas, é importante também que ocorram alterações mínimas nas moléculas constituintes do material para que estas possam ser localizadas em suas posições originais nas células e nos tecidos; b) o material deve permitir a passagem da luz através de seus constituintes e, portanto, deve ser fino e translúcido para ser observado ao microscópio; c) como os componentes celulares e teciduais na sua grande maioria são incolores, é necessário tingi-los diferencialmente para que se forme uma imagem visível e compreensível ao observador; d) a preparação resultante — a lâmina histológica — deve, de preferência, ser permanente, permitindo o seu estoque por longo tempo e sua observação ao microscópio, quantas vezes forem necessárias, sem que haja perda de suas características[1-5].

Para resolver os problemas anteriores, foram criadas inúmeras técnicas de preparo do material biológico. Pretende-se, aqui, descrever as técnicas denominadas "de rotina", pois contêm o princípio básico de todo o processamento de tecidos para observação em microscopia óptica (ou também chamada de microscopia de luz ou de campo claro).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

FIXAÇÃO

A fixação é o primeiro passo para o processamento do material biológico. Com a fixação pretende-se resolver o primeiro problema do preparo do material: mantê-lo, morfologicamente, o mais semelhante possível de quando estava vivo. Rotineiramente, o processo de fixação é feito através de soluções químicas — os fixadores — que contêm substâncias capazes de alterar as ligações químicas dos componentes extra e intracelulares, sem que haja deformação do material. Estas mudanças químicas tornam o material muito mais estável, evitando sua degradação. Um efeito adicional dos fixadores é facilitar e promover a combinação dos componentes químicos das células e tecidos com os corantes que serão utilizados para tingir o material, tendo, assim, também a função de mordente. O bom fixador deve penetrar rapidamente nos tecidos, a fim de promover sua ação fixadora praticamente ao mesmo tempo, tanto nas camadas mais profundas quanto nas mais superficiais. Mesmo um fixador sendo rápido em penetrar nos tecidos, é importante atentar para o fato de que sempre existirá um tempo para que isto ocorra, que será tanto maior quanto maior for a distância a ser percorrida pelo fixador, desde a superfície da peça a ser fixada até sua região mais profunda. Em função disso, é preciso considerar o tamanho da peça e o tipo de tecido a ser fixado, o que vai determinar o tipo de fixador e a maneira como ele entrará em contato com a peça. Existem duas maneiras básicas para fixar tecidos: por imersão ou por perfusão.

PROTOCOLO GERAL DE PREPARO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS

Fixação
↓
Processamento
↓
Corte
↓
Coloração
(Histoquímica e Imuno-histoquímica)
↓
Montagem

Tipos de Fixação

Na *imersão*, a peça é mergulhada dentro do fixador imediatamente após ser retirada do organismo. Mesmo usando-se fixadores de penetração rápida, a peça não deve ter mais de 1cm na sua espessura máxima. Porém, recomenda-se que a espessura seja em torno de 0,5cm. Se for um órgão encapsulado por tecido conjuntivo, a retirada desta cápsula ou a secção do órgão em duas ou mais partes facilitará a penetração do fixador e a conse-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

qüente qualidade de preservação de seus componentes. Como o material biológico é sempre rico em água, deve-se tomar o cuidado para que o fixador seja, no mínimo, 2/3 do volume total compreendido pelo volume da peça mais o volume de fixador no frasco onde será feita a fixação. Quantidades menores de fixador farão com que sua concentração final diminua, reduzindo o seu poder de fixação. Deve-se, também, atentar para o tempo de fixação. Cada fixador tem o seu tempo mínimo para agir, que deve ser respeitado sob pena de causar uma preservação ruim do material biológico, levando a preparações com morfologia alterada e sem confiabilidade. Porém, uma excessiva exposição ao fixador pode levar a maus resultados no momento dos cortes e da coloração. Os cortes podem ser prejudicados pela dureza e esfarelamento do material e alguns corantes podem não tingir satisfatoriamente os tecidos, deixando-os com aparência desbotada. A fixação por *perfusão* é aquela em que o fixador chegará aos tecidos através do sistema circulatório do organismo. É a maneira mais eficaz de fixação, mas também a mais complicada. Este tipo de fixação é muito útil para preservar os tecidos delicados, como o tecido nervoso, e para fixar ao mesmo tempo todos os órgãos de um organismo. É um método muito eficiente, pois vale-se da irrigação íntima que os capilares sangüíneos fazem de todos os tecidos, colocando o fixador em contato com praticamente todas as regiões mais profundas dos órgãos.

Para perfundir um organismo com um fixador, é preciso substituir o sangue do animal primeiramente por solução fisiológica e depois pelo fixador. Normalmente isto deve ser feito com o animal vivo e anestesiado, sendo injetada, junto com a solução fisiológica, uma substância anticoagulante para evitar a formação de trombos dentro dos vasos, especialmente nos de menor calibre. Dependendo do porte do animal, a perfusão pode ser feita diretamente através de um dos lados do coração, abrindo-se o outro lado para a saída do sangue e dos fluidos injetados. Neste caso, usa-se uma bomba de perfusão para forçar a entrada dos fluidos, já que o coração não estará mais funcional. Em outros animais de porte maior, uma artéria ou uma veia principais podem ser canuladas e o animal ser mantido vivo para que o coração se encarregue de bombear os líquidos que estão sendo injetados. Neste caso, em vez de uma bomba de perfusão, pode-se colocar a solução fisiológica e o fixador em frascos suspensos a uma altura tal que a pressão resultante da gravidade sobre a coluna dos líquidos se encarregue de forçar sua entrada pelo sistema circulatório. De qualquer maneira, recomenda-se que a perfusão seja feita por alguém com prática nesta manobra para que se evite o máximo possível de sofrimento ao animal que está sendo perfundido. Como é uma operação relativamente delicada, erros de canulação ou de manutenção do animal anestesiado podem inviabilizar todo o processo.

FIXADORES

Existem muitos tipos de soluções e agentes fixadores em Histologia, cada um com suas peculiaridades e com suas especificidades. O fixador mais utilizado na rotina histológica é a formalina ou o formaldeído. O formaldeído pode ser usado como uma solução aquosa simples ou tamponada, ou em conjunto com outras substâncias. Rotineiramente, por sua quase universalidade em relação

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

aos tipos de tecidos e técnicas de coloração, prefere-se a solução tamponada neutra. Um aspecto que deve ser chamado a atenção é o fato de que o formaldeído é vendido comercialmente em soluções a 40% devido às suas propriedades físico-químicas. Portanto, a solução fixadora denominada comumente formalina 10% na verdade é o resultado da diluição em 1:9 da solu-ção formaldeído a 40%, resultando numa concentração final de formaldeído a 4%.

Além das soluções de formaldeído, outros fixadores podem ser adotados em técnicas específicas ou então serem utilizados conforme as preferências individuais. Uma destas soluções é o fixador de Bouin, que tem uma rápida penetração, provoca pouca retração nos tecidos e é utilizado para ressaltar as cores em técnicas tricrômicas de coloração. Porém alguns cuidados são necessários com este fixador, como o período de até 18 horas para completa fixação e um tempo mais prolongado de lavagem após o corte do material a fim de retirar o excesso de ácido pícrico.

Soluções Fixadoras de Rotina

Solução de Formaldeído a 10% (v/v)

Formaldeído 37-40% (HCHO)	10ml
Água destilada-deionizada	90ml

Solução Tamponada de Formaldeído a 10%

Hidrogenofosfato dissódico ($Na_2HPO_4.H_2O$)	4g
Diidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4)	6,5g
Formaldeído 37-40% (HCHO)	100ml
Água destilada-deionizada	900ml

Solução Salina de Formaldeído a 10% (v/v)

Formaldeído 37-40% (HCHO)	10ml
Solução salina a 0,85%	90ml

Fixador de Bouin

Solução saturada de ácido pícrico ($C_6H_2[NO_2]_3OH$)	75ml
Formaldeído 37-40% (HCHO)	25ml
Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)	5ml

PROCESSAMENTO DE TECIDOS

O segundo problema, anteriormente mencionado, para a observação de tecidos ao microscópio é a necessidade de obtenção de fatias finas e trans-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

lúcidas o suficiente para que possam permitir a passagem da luz e que, conseqüentemente, possam ser observadas ao microscópio. Como os tecidos animais são moles, fica muito difícil obter cortes com espessuras entre 4 e 5µm, que permitam a observação das células dos tecidos sem que haja sobreposição de camadas. Com o objetivo de tornar o material mais duro para o corte sem que ocorram alterações na sua constituição, existem duas maneiras de processá-lo: por *congelação* ou por *inclusão em meio sólido*. Após o processamento, o material será cortado em fatias muito finas em um aparelho chamado micrótomo e então distendido e colado em uma lâmina de vidro para posteriormente ser corado.

CONGELAÇÃO

Esta técnica de processamento de tecidos é utilizada basicamente por dois motivos: rapidez no processamento e preservação de características bioquímicas dos tecidos. Na técnica de congelação, o material torna-se duro para o corte porque é submetido a baixas temperaturas e pode ser cortado imediatamente. Ao contrário, na técnica de inclusão em meio sólido, a preparação do material exige um longo processo antes de este estar em condições de ser cortado. Além disso, o processamento de inclusão em meio sólido provoca alteração em muitas moléculas constituintes dos tecidos, o que impede a realização de muitas técnicas histoquímicas, que se baseiam fundamentalmente em reações químicas provocadas *in situ*. Também várias técnicas de imuno-histoquímica necessitam ser realizadas em cortes feitos por congelação, pois muitos antígenos alteram seus epítopos quando submetidos ao processamento por inclusão em meio sólido. Outro ponto a favor da congelação refere-se aos lipídios, que durante o processamento em meio sólido são dissolvidos e perdidos e que ficam preservados tanto nas suas características químicas quanto na posição original nas células e nos tecidos.

Apesar destas vantagens, a inclusão por congelação apresenta também algumas desvantagens. Em relação à morfologia dos tecidos, esta técnica é criticada por alterar a forma das células, pois se o processo não for realizado com muito cuidado, a formação de cristais de gelo, tanto no meio intra quanto no extracelular, pode deformar os tecidos. O fato de preservar melhor as moléculas dos tecidos nem sempre é fator de sucesso, principalmente em técnicas imuno-histoquímicas, pois algumas moléculas hidrossolúveis tendem a sair dos cortes quando estes forem descongelados. Para evitar isto, há a necessidade de se usar um fixador, o que provoca muitas vezes a alteração estrutural do antígeno, exatamente o que se procurava evitar.

O processamento por congelação é feito pela imersão do material em uma forma contendo um meio crioprotetor especial para fins histológicos. Após, a forma com o material é submergida em nitrogênio líquido para congelar e transferida para um *freezer*, onde é estocada. Imediatamente após a congelação em nitrogênio, o material também já pode ser cortado. Os cortes são feitos dentro de um aparelho chamado criostato, que na verdade é um micrótomo instalado dentro de um *freezer*, que mantém a temperatura do equipamento e dos blocos por volta de -20°C.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

INCLUSÃO EM MEIO SÓLIDO

A outra maneira de tornar o material biológico suficientemente duro para permitir os cortes finos é fazer com que este material fique incluso dentro de um meio mais rígido. Quando se diz incluir o material, significa fazer com que o meio de inclusão penetre nos tecidos em substituição de outro componente das células e do meio extracelular. Assim, o meio de inclusão substituirá a água dos tecidos, o que exigirá que durante o processamento haja desidratação completa do material. Ao término do processamento, o material fará parte de um bloco único e contínuo com o meio de inclusão, que será cortado no micrótomo fornecendo uma fatia que conterá o material. Após o corte ser colado na lâmina, o meio de inclusão é retirado e o material é novamente hidratado, para que se procedam as técnicas de coloração ou de imuno-histoquímica. Os meios de inclusão mais utilizados são a parafina e as resinas. As resinas são substâncias que apresentam facilidade de penetração nos tecidos desidratados e, quando em contato com um agente catalisador, polimerizam, adquirindo uma grande rigidez. Uma resina bastante utilizada é o metacrilato, que permite cortes de até 0,5μm de espessura com navalhas especiais. Porém, o meio de inclusão mais utilizado é a parafina, devido à sua facilidade de manuseio e custo muito baixo em relação a outros meios. Em função disto, o processamento da inclusão em parafina é que será descrito em detalhes. Após o material estar devidamente fixado, ele deve ser retirado do fixador e lavado por 10 a 20 minutos em água corrente para retirar o excesso de fixador. O passo seguinte será a desidratação do material, que deve ser feita de maneira que a água seja retirada de dentro dos tecidos, sem ocorrer sua deformação devido à perda de volume. Assim, a água deve ser substituída por outra substância que ocupe seu lugar. O ideal seria que esta substância fosse a parafina derretida, que solidificaria, depois de resfriada, formando o bloco desejado. O problema é que a parafina, sendo um composto lipídico, não é miscível com a água. É necessário, pois, haver substâncias intermediárias entre as duas para que, depois de sucessivas trocas, o material fique completamente impregnado de parafina. As substâncias intermediárias utilizadas são o etanol e o xilol. O primeiro é miscível tanto em água quanto em xilol e este último funciona como solvente da parafina, mas não é miscível em água. Portanto, para desidratar o material usa-se uma série de misturas de concentração crescente de etanol e água, iniciando com etanol 70% até que o material fique imerso em etanol 100%, o que significa que toda a água dos tecidos foi retirada e substituída pelo álcool. Depois, o material passa por banhos de xilol, quando então o álcool é retirado e o material estará completamente cheio de xilol.

Nesta altura do processamento há a oportunidade de se conferir se a desidratação ocorreu a contento. Como a água e o xilol não se misturam, se as peças retiradas do etanol 100% forem mergulhadas no xilol e este tornar-se turvo, com aspecto leitoso, é sinal de que ainda existe água dentro dos tecidos e as peças devem retornar novamente para o álcool. Muitas vezes, os frascos onde o etanol está armazenado não se encontram bem fechados, fazendo com que a umidade do ar diminua a concentração do álcool. Ou então, o tempo de permanência das peças dentro da série alcoólica não foi suficiente e o protocolo utlizado deve ser revisado. Existem alguns pontos

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

em que o protocolo de processamento dos tecidos pode ser interrompido. Quando o material estiver no fixador, a urgência em retirá-lo deste meio será mais em função da qualidade posterior dos cortes e coloração, como já foi comentado. Outro ponto de parada pode ser quando o material estiver em etanol a 70%. Nesta concentração, o álcool funciona como um conservante, permitindo que o material fique imerso nesta solução por períodos prolongados de tempo com um mínimo de alteração. Recomenda-se, porém, que a solução seja trocada periodicamente, pois a tendência é que o álcool evapore e a solução torne-se menos concentrada com o passar do tempo. Depois de impregnado de xilol, o material será incluído em parafina. Este meio de inclusão foi escolhido em função do seu ponto de fusão, que ocorre entre 56°C e 58°C. As substâncias constituintes dos tecidos que já se encontram fixadas são estáveis até pouco mais de 60°C e, portanto, o material pode ser aquecido até esta temperatura sem que o mesmo se altere. Esta parte do processo deve ser realizada dentro de uma estufa que mantenha a temperatura da parafina próxima do ponto de fusão sem elevá-la demais. Como a penetração da parafina nos tecidos é mais lenta, geralmente são feitos três banhos até que todo o xilol tenha sido retirado e que o material esteja completamente embebido na parafina. Com o auxílio de formas de metal, plástico ou papel, são feitos pequenos blocos de parafina onde o material embebido é colocado para posteriormente ser cortado. Todo o processamento de tecidos pode ser feito manualmente em laboratório usando-se frascos para os banhos de álcool e xilol (para este último usar frascos de vidro) e de uma estufa para manter a parafina derretida. Porém, o protocolo completo, desde o primeiro banho de álcool a 70% até o bloco de parafina com o material incluído, leva bastante tempo para ser completado. Para esta parte do processamento de tecidos existem no mercado aparelhos que fazem esta rotina automaticamente. Um processador automático de tecidos é um aparelho que, funcionando como um carrossel, troca as peças de um frasco para outro conforme o tempo estabelecido no relógio incorporado no aparelho (Fig. 31.1). Os dois ou três últimos recipientes do carrossel são mantidos aquecidos por resistências elétricas e contêm a parafina derretida. Alguns modelos possuem também um sistema gerador de vácuo dentro dos frascos, o que aumenta a eficiência das trocas de substâncias ao longo do processo. No caso dos banhos de parafina, a geração do vácuo garante uma completa penetração desta substância nos tecidos, evitando o aparecimento de bolhas no seu interior, que prejudicam a qualidade dos cortes do bloco no micrótomo.

Para laboratórios com um grande volume de trabalho, existem também consoles de emblocamento de material (Fig. 31.2). Estes consoles mantêm dois reservatórios de parafina derretida na temperatura ideal, um deles para a manutenção de várias peças, enquanto uma está sendo trabalhada, e outro com uma torneira que despeja a parafina derretida dentro das formas para confecção dos blocos. Como acessório, estes consoles podem vir acompanhados de uma mesa refrigerada, onde as formas com a parafina ainda derretida são colocadas para que a mesma solidifique uniformemente e se solte da forma com mais facilidade.

As formas para confecção dos blocos são de aço inoxidável e podem ser adquiridas no mercado. Em laboratórios em que não haja demanda muito grande, pode-se utilizar formas de papel acetinado feitas de dobradura,

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte



Fig. 31.1 — *Processador automático de tecidos. (Cortesia Leica Aotec.)*

ou até mesmo formas de papel para docinhos. A desvantagem destas formas de papel está no fato de que elas dificilmente ficam com a face de corte do bloco planas o suficiente, exigindo posterior emparelhamento. Muitas vezes, também, o papel gruda na parafina e deve-se ter o cuidado de retirá-lo completamente para que não seja cortado pela navalha do micrótomo, o que fará com que a mesma perca o fio. Alternativamente, pode-se utilizar prismas de metal encostados uns nos outros sobre uma superfície lisa, como um azulejo. O espaço entre os prismas deve formar um cubo onde a parafina derretida seja despejada e o material colocado na posição que facilite o corte no micrótomo. Outra possibilidade é a utilização de formas plásticas para fazer gelo. Estas têm a desvantagem de tornar bastante difícil a retirada do bloco de parafina sólido. Mesmo colocando a forma em geladeira para facilitar a retirada, corre-se o risco de a parafina apresentar rachaduras devido ao resfriamento, inutilizando o bloco e exigindo que a peça seja derretida novamente para fazer novo bloco. Ao manipular o material na parafina líquida, é preciso aquecer a ponta da pinça utilizada para que a parafina não solidifique ao encostar no metal frio. Quando o material estiver incluído dentro da parafina solidificada, temos outro ponto do processo em que pode haver uma parada por tempo indeterminado. Teoricamente, uma peça dentro de um bloco de parafina estocado de maneira satisfatória pode ser utilizada indefinidamente sem que o material nele incluído sofra alguma alteração. Para tanto, os blocos devem ser guardados em lugar fresco (devido ao baixo ponto de fusão da parafina), seco (para evitar a formação de fungos) e ao abrigo da luz.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

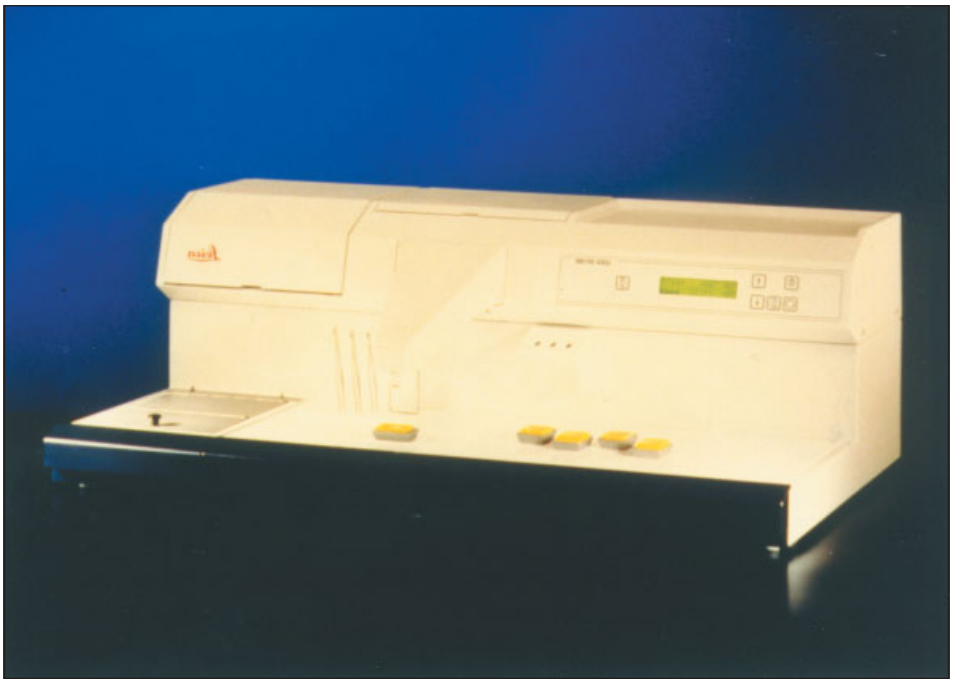


Fig. 31.2 — *Console para confecção de blocos de parafina. (Cortesia Leica Aotec.)*

PROTOCOLO BÁSICO PARA INCLUSÃO EM PARAFINA

Lavagem no fixador: 10 a 30min.
↓
Etanol a 70%: mínimo 1 hora
↓
Etanol a 80%: 1 hora
↓
Etanol a 90%: 1 hora
↓
Etanol a 100%: 3 x 1 hora
↓
Xilol: 2 x 1 hora
↓
Parafina: 3 x 1 hora
↓
Blocos

CORTES

Os cortes são feitos num aparelho chamado micrótomo (Figs. 31.3 e 31.4). Este aparelho é munido de uma navalha de aço com um fio muito fino e regular e de um mecanismo de precisão capaz de fazer com que o bloco a

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

ser cortado avance em direção à navalha em micrômetros ou décimos de micrômetros. As navalhas podem ser descartáveis ou não. O uso de navalhas descartáveis é muito mais prático, pois para afiar uma navalha permanente é preciso um aparelho especial e o processo é demorado, exigindo do operador prática e habilidade para assentar o fio após a retirada do afiador. Antes de iniciar os cortes é preciso preparar os blocos. O primeiro passo é fixar o bloco num suporte que servirá para prendê-lo no micrótomo.

O suporte pode ser um taco de madeira, no qual, derretendo-se um pouco de parafina, se prende o bloco a ser cortado. Existem também suportes plásticos que são vendidos comercialmente junto com as formas de metal para a confecção dos blocos. Ao encher a forma, o suporte é posicionado enquanto a parafina ainda está líquida, ficando firmemente preso após ela solidificar. Outra possibilidade é a utilização de cassetes plásticos que têm o aspecto de pequenas gaiolas, nos quais o material é processado durante a desidratação e inclusão em parafina. O material é retirado do cassete para ser posicionado na forma e o próprio cassete é utilizado como suporte para o bloco (Fig. 31.5).

Quando os blocos são feitos com formas próprias, podem ser imediatamente levados para o corte em micrótomo. Mas, se forem utilizadas formas de papel ou de gelo para a confecção dos blocos, após serem retirados da forma será necessário esculpir as suas faces para que os cortes não fiquem com uma superfície muito ampla de parafina, fazendo com que eles enrolem sobre a navalha. Blocos com arestas bem retas também facilitam o corte. Outro problema que ocorre com formas de material mole é que a superfície a ser cortada não fica plana, exigindo que sejam feitos vários cortes com o micrótomo até que se chegue ao material incluso. Neste procedimento, o

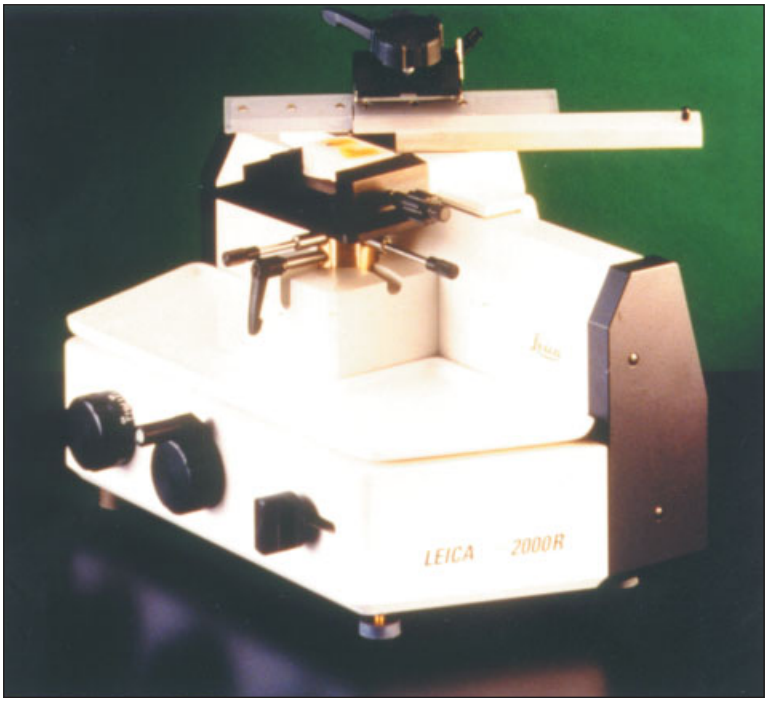


Fig. 31.3 — *Micrótomo de deslize. (Cortesia Leica Aotec.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte



Fig. 31.4 — *Micrótomo rotativo. (Cortesia Leica Aotec.)*

fio da navalha vai sendo perdido, o que implica a troca da mesma, se for do tipo descartável, ou a necessidade de afiar com mais freqüência aquelas não descartáveis. Ao fazer o corte de um bloco em micrótomo, o operador deve conferir se a navalha está com o fio em condições e se o ângulo em que ela está colocada é o recomendado pelo fabricante do aparelho. Deixar o bloco de parafina por alguns minutos dentro da geladeira ou numa caixa de isopor com gelo ajuda a torná-lo mais duro, facilitando o corte. Mas atenção: tempo demais em temperaturas baixas pode rachar o bloco ou desprendê-lo do suporte. Após emparelhar a superfície de corte usando a regulagem do micrótomo para espessuras maiores (10 a 15μm), o aparelho deve ser regulado para cortes de 4 a 5μm. Tirar os dois primeiros cortes e desprezá-los, pois assim a superfície do corte seguinte vai estar no padrão desejado. Com o auxílio de um pincel, recolher o corte e colocá-lo para flutuar num recipiente com água fria para que este desenrole e estique. A superfície que passou pela navalha é mais lisa e brilhante do que aquela que estava expos-

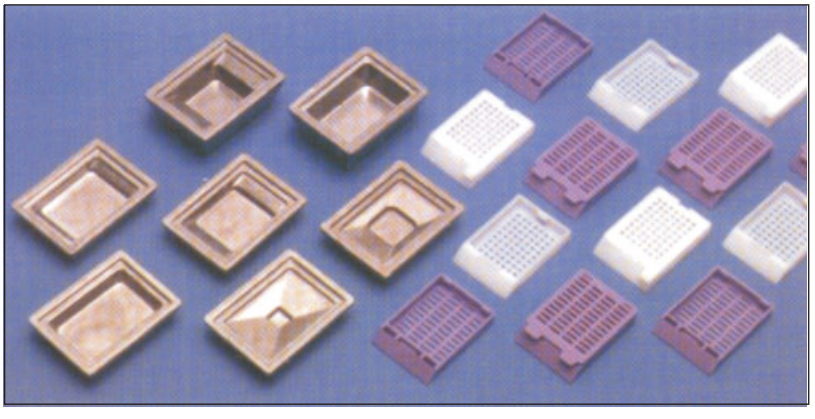


Fig. 31.5 — *Formas cassetes para processamento e confecção de blocos. (Cortesia Leica Aotec.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

ta no bloco e deve ficar sempre para baixo, em contato com a água ou com a lâmina. Depois que o corte tenha desenrolado, recolhê-lo sobre a superfície de uma lâmina e transferi-lo para um recipiente com água aquecida a mais ou menos 40°C para que fique bem esticado e plano. Quando estiver bem esticado, recolher o corte com uma lâmina e deixá-la levemente inclinada para escorrer o excesso de água. As lâminas são então colocadas sobre uma chapa aquecida por uma resistência elétrica por aproximadamente uma hora para secar e terminar de esticar o corte sobre a lâmina. Após, colocar as lâminas em estufa a 37ºC por uma noite para que sequem completamente e para que os cortes fiquem bem grudados a elas. Depois de secas, as lâminas podem ser guardadas por tempo indeterminado, desde que o ambiente seja seco, fresco e ao abrigo da luz. Para preparações de rotina, pode-se utilizar lâminas para microscopia bem limpas sem necessidade de uma substância para aderir o corte à lâmina, principalmente se forem bem secas em estufa com os cortes. Porém, recomenda-se que as lâminas sejam recobertas com uma solução de poli-L-lisina, que pode ser obtida comercialmente. Esta substância promoverá a adesão dos cortes sem interferir nas colorações ou na imuno-histoquímica. Outras alternativas são a albumina de ovo e a gelatina, mas estes procedimentos não são recomendados porque geralmente estas substâncias acabam retendo corante mesmo após as lavagens, conferindo uma coloração de *background*, principalmente nas técnicas de imuno-histoquímica. Tanto as lâminas quanto as lamínulas a serem usadas devem ser bem limpas e livres de gordura e partículas. Para tanto, devem ser lavadas com água e detergente e postas para secar antes do uso. Se necessário, passar também uma gaze com álcool, evitando que fiapos fiquem na superfície. Alguns fabricantes estrangeiros já embalam as lâminas e as lamínulas perfeitamente limpas, mas a maioria daquelas de fabricação nacional ou algumas estrangeiras de baixa qualidade vêm com muito pó de vidro e sujeira, exigindo uma limpeza cuidadosa antes do uso.

COLORAÇÃO

O material biológico, com raras exceções, é incolor, exigindo que seja tingido para que possa ser observado. Existem inúmeras técnicas para corar tecidos e células, cada uma com sua especificidade para os elementos que se quer destacar. A técnica mais utilizada — e a que será descrita aqui — combina dois corantes: a eosina e a hematoxilina. O primeiro é considerado um corante basófilo, pois tem afinidade com os componentes alcalinos das células e da matriz extracelular, corando-os num gradiente de rosa-pálido a vermelho-forte, conforme o grau de afinidade. Já a hematoxilina é um corante acidófilo, pois se combina com os componentes ácidos, especialmente ácidos nucléicos, tingindo-os de roxo-escuro ou preto, conforme a fórmula de preparação do corante. Como ambos os corantes são largamente utilizados em laboratórios de Histologia e Patologia, podem ser encontrados prontos no comércio, evitando perda de tempo no seu preparo, especialmente da hematoxilina, que possui várias formulações e tempo de maturação.

Os cortes que estão aderidos às lâminas e ainda embebidos em parafina devem ser processados de maneira que a parafina seja removida, devem ser novamente hidratados para receber os corantes e, depois, desidratados

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

mais uma vez para a montagem definitiva da lâmina histológica. Para a retirada da parafina, usa-se o xilol, que será substituído, em seguida, por etanol em concentrações decrescentes (100%, 90%, 80% e 70%) até que as lâminas fiquem em água destilada. Só assim os corantes poderão penetrar nos tecidos, pois são soluções aquosas. Mas, atenção: nunca deixe os cortes secar, eles devem estar sempre embebidos em líquido para evitar deformações nos componentes dos tecidos. A hematoxilina é um corante que pode ser preparado de várias maneiras. Algumas formulações precisam de um tempo de maturação do corante e outras utilizam vários componentes na fórmula. De modo geral, a formulação de Harris é uma das mais utilizadas e está aqui descrita, pois pode ser usada imediatamente após ser preparada.

A eosina, apesar de ser um corante bastante conhecido, na verdade é um composto que tem algumas variantes. Existem a eosina Y ou amarelada (solúvel em água), a eosina S ou etil-eosina (solúvel em água) e a eosina B ou azulada. Em geral, a eosina Y é a mais utilizada nas técnicas de rotina e é de fácil preparo.

Para corar algumas lâminas de cada vez, pode-se utilizar recipientes especiais com ranhuras onde se encaixam as lâminas, trocando-as de um recipiente para outro. Quando é necessário corar um grande número de lâminas, usa-se um recipiente em forma de cuba e as lâminas encaixadas em cestos de metal ou vidro. Cada solução do protocolo é colocada em uma cuba e o cesto é mergulhado nas cubas na seqüência estabelecida e pelo tempo determinado.

Corantes

Hematoxilina de Harris

Hematoxilina, forma cristalina (CI 75290-Merck) ($C_{16}H_{14}O_6$)	2,5g
Álcool etílico absoluto (C_2H_6O)	25ml
Sulfato de alumínio e potássio (alúmen potássico) ($AlK[SO_4]_2.12H_2O$)	50g
Água destilada-deionizada	50ml
Óxido de mercúrio II (HgO)	1,25g
Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)	20ml

• Dissolver a hematoxilina no álcool etílico e acrescentar o alúmen previamente dissolvido em água destilada-deionizada aquecida. Levar a mistura ao fogo e deixar ferver rapidamente para acrescentar o óxido de mercúrio. Resfriar rapidamente colocando o frasco da mistura em banho de água fria. Quando a mistura estiver fria, acrescentar o ácido acético glacial.

Solução de Eosina a 1% (m/v)

Eosina Y (amarela) (CI 45380) ($C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$)	1g
Água destilada-deionizada	100ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

• Dissolver a eosina em água destilada-deionizada e acrescentar cristal de timol ($C_{10}H_{14}O$) para evitar a formação de fungos. A adição de duas a três gotas de ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$) pode tornar a coloração mais forte.

PROTOCOLO BÁSICO PARA COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA

Deparafinar em xilol: 3 x 5min.
↓
Etanol a 100%: 2 x 5min.
↓
Etanol a 90%: 5 x 5min.
↓
Etanol a 80%: 5min.
↓
Etanol a 70%: 5min.
↓
Água destilada: 5min.
↓
Hematoxilina de Harris: 3 a 10min.
(conferir ao microscópico a intensidade)
↓
Lavar em água corrente até a cor passar da tonalidade vermelho-vinho para roxo-azulada
↓
Água destilada: 1min.
↓
Eosina: 1 a 3min.
(conferir ao microscópio a intensidade)
↓
Lavar rapidamente em etanol a 70%

MONTAGEM

Após a coloração e a lavagem do excesso de corante, os cortes precisarão ser novamente desidratados e ser diafanizados para então receberem uma lamínula que será colada com uma resina. O preparo para a montagem segue o protocolo inverso ao do preparo para a coloração. Os cortes serão desidratados com etanol em uma série de concentrações crescentes até 100%. O álcool será substituído pelo xilol, que tornará o corte translúcido e que, ao mesmo tempo, é solvente da resina utilizada para colar a lamínula. Existem várias resinas que são utilizadas para este propósito (por exemplo, bálsamo

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

do Canadá, Entelan® etc.). Estas substâncias devem, ao mesmo tempo, grudar a lamínula à lâmina, impedir a entrada de ar e umidade no corte, penetrando nos tecidos, e ter o mesmo índice de refringência e transparência do vidro. Assim, este verdadeiro sanduíche deve permitir o mais possível a passagem da luz através de si para que seja possível observar as estruturas coradas em grandes aumentos no microscópio.

Para a montagem final, é importante que a superfície da lâmina com o corte fique com um pouco de xilol para ajudar a resina a se espalhar sobre o corte, penetrando bem nos tecidos. Com um bastão fino de vidro, pingar a resina sobre o corte e depois, com o auxílio de uma agulha histológica, colocar a lamínula inclinada sobre a gota, fazendo com que a resina se espalhe uniformemente entre ela e a lâmina, sem que se formem bolhas de ar. Ao colocar a resina para a montagem, deve-se ter o cuidado de evitar mexer muito na resina para que não se formem, também, pequenas bolhas de ar dentro do frasco de resina, que muitas vezes não são percebidas a olho nu, mas que prejudicam a observação ao microscópio. Com um pedaço de papel-filtro, limpa-se a área ao redor da lamínula para retirar o excesso de resina que porventura tenha transbordado. Se a quantidade for muito grande, o papel-filtro pode ser umedecido com xilol. Depois de montadas, as lâminas devem ficar numa bandeja em lugar bastante arejado, mas sem poeira, por algumas horas para que o xilol e os solventes da resina evaporem e a resina seque completamente. Somente depois da resina estar bem seca é que as lâminas podem ser guardadas em caixas próprias no sentido vertical.

PROTOCOLO PARA MONTAGEM DE LÂMINAS PERMANENTES

Etanol a 70%: 3min.
↓
Etanol a 80%: 3min.
↓
Etanol a 90%: 3min.
↓
Etanol a 100%: 3 x 3min.
↓
Xilol: 3 x 5min.
↓
Montagem com resina

RECOMENDAÇÕES GERAIS

A seguir serão feitas algumas observações sobre alguns cuidados importantes a serem observados nos protocolos em Histologia.

1. A maioria das substâncias utilizadas nos protocolos é inflamável. Portanto, as medidas de segurança para a sua manipulação e estoque devem ser rigorosamente observadas.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Estas substâncias são também muito voláteis e, por isso, o ambiente onde os protocolos serão executados devem ser arejados para evitar o acúmulo de vapores e a intoxicação do pessoal do laboratório. De preferência, a troca de substâncias durante o processamento e as baterias de cubas do processo de coloração e montagem de lâminas devem estar em local com contínua exaustão do ar, como uma capela, por exemplo.

3. Evitar inalar os vapores de xilol, bem como evitar o contato prolongado desta substância com a pele.

4. Ao derreter parafina, nunca fazê-lo com o recipiente no fogo direto e sim em banho de água.

5. Cuidar para que o termostato da estufa que contenha parafina esteja bem regulado, pois um aumento excessivo e contínuo da temperatura pode inflamar esta substância.

6. Usar sempre avental para evitar que pingos de solventes ou de parafina ou de corante estraguem as roupas.

7. Guardar os corantes sempre ao abrigo da luz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bancroft JD, Stevens A. Theory and practice of histological techniques. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990.
2. Clark G, ed. Staining procedures. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1981.
3. Culling CFA, Allison RT, Barr WT. Cellular Pathology Technique. 4th ed. London: Butterworths, 1985.
4. Gu J, ed. Analytical morphology. Boston: Birkhäuser, 1997.
5. Lillie RD. Biological Stains. 9th ed. Saint Louis: Sigma Chemical Co., 1990.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte



SEÇÃO 9

Controle de Qualidade e Biossegurança

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CAPÍTULO 32



Controle de Qualidade em Parasitologia Clínica

Geraldo Attilio De Carli
Osmar Luiz M. de Oliveira

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A maioria dos parasitos intestinais é diagnosticada pelo exame das fezes, embora outros materiais, como urina, escarro, secreções urogenitais, aspirados, tecidos, conteúdo duodenal e espécimes obtidos por biópsia, possam ser utilizados para a identificação de certas espécies. Na realidade, uma identificação segura e correta de um parasito depende de critérios morfológicos, os quais estão sujeitos a uma colheita bem feita e a uma boa preservação dos espécimes. O nível da *performance* de qualquer diagnóstico de laboratório em Parasitologia Clínica é um reflexo direto do treinamento e da qualificação do pessoal técnico, dos recursos do laboratório e dos esforços positivos concernentes à melhoria do desempenho. A aplicação dos procedimentos de controle de qualidade (CQ) para o diagnóstico parasitológico talvez ainda não apresente regras rígidas em conseqüência da indefinição e do equacionamento dos diferentes procedimentos de diagnóstico. O CQ é realizado através do monitoramento da metodologia empregada na realização de um processo analítico. O CQ inclui: a) preparação adequada, armazenamento e preservação dos espécimes submetidos ao diagnóstico; b) avaliação permanente dos reativos e reagentes; c) monitoramento do equipamento; d) correta supervisão e treinamento periódico da equipe técnica; e e) uso de manuais de procedimentos, revistas específicas e referências bibliográficas, as quais sempre deverão estar à disposição dos laboratoristas[3,15,17].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Garantia de Qualidade

A garantia de qualidade (GQ)[21-23,29] é um programa em que todas as atividades realizadas pelo laboratório são diretamente conduzidas no sentido de assegurar a qualidade de todo o processo. As Boas Práticas Laboratoriais (BPL) são normas que disciplinam a organização, o funcionamento e as condições sob as quais os exames são planejados, registrados, liberados e como as amostras são preservadas e descartadas e os resultados arquivados. Esses processos incluem atividades pré-analíticas, analíticas e pós-analíticas.

Atividades Pré-Analíticas

Essas atividades não incluem as manipulações diárias dos espécimes que influem na qualidade dos resultados do laboratório.

Treinamento do Pessoal Técnico

a. A orientação dos pacientes ou do corpo médico deve ser feita por pessoas treinadas em todas as fases da colheita da amostra (preparação do paciente, horários para a colheita dos espécimes, qualidade e volume da amostra, condições dos recipientes de colheita, uso de preservadores e correta identificação).

b. O pessoal técnico responsável pela realização dos exames parasitológicos deve estar familiarizado com todos os procedimentos técnicos indicados para cada tipo de amostra e com o reconhecimento dos estágios usuais de diagnóstico. A identificação segura e correta de um parasito depende de critérios morfológicos, os quais estão sujeitos a uma colheita bem feita e a uma boa preservação dos espécimes fecais.

Preparação do Paciente

O paciente deve receber instruções claras e impressas para facilitar a colheita das fezes e orientações para a colheita de ovos de *Enterobius vermicularis*, a qual deverá ser realizada pela manhã, antes de defecar ou banhar-se. Quando houver solicitação médica, o paciente deve receber informações impressas sobre o correto uso de laxantes.

Colheita da Amostra

a. Esclarecimento aos pacientes de que a possibilidade de encontrar organismos parasitos nas fezes aumenta pelo exame de amostras múltiplas, que a colheita deverá ser retardada por um período de sete a 10 dias, quando as amostras excretadas contenham bário ou bismuto, e que certos medicamentos e produtos químicos podem tornar a amostra insatisfatória para a análise.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

b. Colheita do sangue periférico humano para o diagnóstico de hemoparasitos dirigida diretamente para a parasitose suspeita.

Qualidade e Volume das Amostras

Transporte e Identificação das Amostras

Atividades Analíticas

1. Nessa atividade, estão incluídos os procedimentos técnicos ou laboratoriais necessários para a produção de resultados acurados.

a. O manual de procedimentos deve apresentar minuciosa descrição dos procedimentos indispensáveis ao processamento dos espécimes e da identificação dos diferentes parasitos em seus estágios de diagnóstico.

b. A descrição dos métodos e/ou das técnicas deve fazer parte do manual de procedimentos, o qual, quando aprovado pelo diretor do laboratório, se torna um protocolo legal que deverá ser seguido por cada laboratorista.

c. O manual de procedimentos deverá ser revisado anualmente; após, as alterações deverão ser submetidas e aprovadas pelo diretor do laboratório.

2. Nessas atividades, também estão incluídas as expressões do CQ e os testes de proficiência, incluindo um plano de ação corretiva quando os resultados esperados não são obtidos. É importante realizar a manutenção preventiva e a calibração do equipamento.

Atividades Pós-Analíticas

1. Nessa atividade, estão incluídas as informações transmitidas verbalmente, ou escritas ou através de meios eletrônicos, do laboratório ao clínico, permitindo a esse um tratamento imediato do paciente. Nesse relatório, são descritos com amplitude os procedimentos realizados, a presença das anormalidades vistas na amostra, presença de sangue ou leveduras, células etc. e a identificação do(s) parasito(s) diagnosticado(s).

2. São acrescidas informações qualificadas relacionadas com a qualidade dos espécimes fecais, tais como "*inadequadamente preservado quando recebido no laboratório*" ou "*contaminada com água ou urina*".

Controle de Qualidade Interno

O CQ interno[23,29], um dos componentes do programa de CQ, consiste na documentação do correto funcionamento dos reagentes e equipamentos em determinados intervalos de tempo e na avaliação da *performance* (diária e/ou de lote para lote) das amostras individuais, e, dentro de cada lote, na realização de estudos de reprodutibilidade. No CQ interno, é necessário e importante seguir as seguintes fases: a) controlar o corante após nova preparação (ou quando um novo número de lote é comprado) e anotar o período

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

de validade desse no rótulo do frasco; b) controlar semanalmente os métodos de coloração permanente com amostras positivas e registrar todos os resultados do CQ; c) quando amostras positivas não são disponíveis, usar fezes contendo células epiteliais ou pus; d) controlar, no momento do uso e periodicamente, para qualidade de coloração, os corantes para parasitos do sangue; quando preparações sangüíneas positivas não são disponíveis, usar esfregaços negativos; e e) introduzir, previamente, espécimes identificados como amostras positivas para estimar a *performance* total do laboratório de Parasitologia. O uso dessas amostras é de importância vital para os laboratórios que processam poucas amostras e para aqueles que recebem poucos espécimes positivos.

Controle de Qualidade Externo

Todo laboratório de Parasitologia deve ser submetido a programas de proficiência para pôr em prática uma imparcial avaliação dos procedimentos de diagnóstico. O controle deve ser aplicado a todas as áreas da Parasitologia[23].

Material de Referência

O material de referência é de importância primordial na comparação das amostras clínicas com os organismos desconhecidos durante os treinamentos regulares e no adestramento dos novos analistas. O material de referência ideal inclui: a) ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários intestinais preservados no formaldeído; b) esfregaços permanentes corados para o estudo de oocistos, cistos, trofozoítos e esporos de protozoários intestinais; c) preparações sangüíneas positivas; e d) *slides* coloridos, atlas, livros e manuais de diferentes autores usados como materiais de referência. Os cartazes fixados às paredes devem ser mantidos para rápida consulta; entretanto, um completo manual de procedimentos de rotina é obrigatório e indispensável para o funcionamento do laboratório[23].

Manual de Procedimentos

O manual de procedimentos[15,23,29] deve conter as instruções e informações específicas para todo o laboratório. O uso correto do manual reduzirá os erros e irá impedir que as condutas abreviadas e comprometedoras não se tornem procedimentos de rotina. O manual não deverá ser uma coleção de páginas reproduzidas por xérox (cópias xérox de livros, de instruções ou folhas de informações dos fabricantes). Cada teste realizado no laboratório deve ter um procedimento separado e informações pertinentes escritas em estilo uniforme e organizados da mesma forma. Cada procedimento de laboratório deverá conter as seguintes informações:

Nome do teste: para facilitar a identificação, listar no início do procedimento o nome completo do método ou técnica, como também outro nome alternativo e as abreviaturas rotineiramente usadas.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

***Fundamento do teste*:** descrição resumida do fundamento do método e/ou técnica e suas aplicações clínicas.

***Orientação ao paciente*:** o paciente deverá receber instruções impressas para facilitar a colheita das fezes e para a pesquisa de ovos de *Enterobius vermicularis*.

***Colheita e transporte das amostras*:** cada amostra fecal deverá apresentar no mínimo as seguintes informações: nome do paciente, número de identificação, nome do médico, data e horário da colheita, a qual deverá ser acompanhada de uma requisição médica, indicando o procedimento laboratorial a ser seguido. O recipiente deve ser limpo e seco e ter vedação hermética, para impedir o derrame, permitindo a preservação da umidade. O pote deve estar livre de anti-sépticos, de agentes germicidas, de gotas de óleo e de urina. Quando é solicitada uma amostra de sangue, usar o anticoagulante indicado para a pesquisa dos parasitos. Observar o horário correto durante a colheita das amostras sangüíneas para a pesquisa de filárias.

Espécimes aceitos e instruções para a correta colheita e preparação da amostra (incluindo os critérios de rejeição): a pesquisa dos enteroparasitos deve ser realizada antes de o paciente ser submetido a um exame radiológico, com a administração do contraste sulfato de bário. As amostras excretadas que contenham bário ou bismuto são inaceitáveis para o exame, visto que partículas desses produtos podem interferir no exame pelo excesso de substâncias cristalinas, as quais podem destruir os trofozoítos devido à sua ação abrasiva. A amostra seca na superfície e nas bordas deve ser rejeitada. Para permitir exames macro e microscópico satisfatórios todo o bolo fecal deve ser enviado ao laboratório; caso esse procedimento não possa ser cumprido, uma quantidade mínima de 20 a 30g pode ser empregada na análise. Todo o material fecal deve ser transportado com cuidado, desde que esse espécime representa uma fonte em potencial de infecção (bactérias, vírus, fungos e parasitos). Os recipientes com amostras fecais, recebidos de pacientes imunocomprometidos (síndrome da imunodeficiência adquirida — SIDA), deverão ser protegidos por um invólucro de plástico e identificados com etiqueta vermelha ou como HIV positivo. Todas as amostras fecais colhidas devem ser levadas imediatamente ao laboratório. O tempo de exame recomendado para os espécimes líquidos é de 30 minutos, enquanto as amostras pastosas devem ser examinadas dentro de uma hora após a evacuação; não sendo possível observar essa orientação, o material deverá ser preservado.

***Preparação dos reagentes e soluções*:** a qualidade e a confiança dos corantes, preservadores e outros reagentes são de grande importância no diagnóstico laboratorial. Todas as soluções devem ser adequadamente rotuladas com uma clara e legível descrição do conteúdo, fórmula química, data da preparação (ou quando foi comercialmente comprado, marcar a data do recebimento) e data de validade. Modo de preparação e instruções para o armazenamento. Acrescentar no rótulo a data quando o CQ foi realizado. O rótulo dos reagentes contendo veneno, como os fixadores de Schaudinn e álcool polivinílico (fixador APV), deverá ser claramente identificado como VENENO. Na preparação dos corantes e das soluções o uso da balança é crítico.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

***Instrumentos e equipamentos*:** todos os instrumentos, equipamentos e materiais necessários para a realização do procedimento devem ser relacionados. A vidraria e os materiais descartáveis devem também ser listados.

***Conduta com o CQ, resultados e interpretação (incluindo o efeito corretivo quando o CQ está fora de controle*):** as fórmulas de todos os cálculos necessários para a determinação dos resultados finais são acrescidas de exemplos demonstrando a realização das avaliações.

***Descrição dos métodos e/ou das técnicas*:** é necessário nessa seção uma completa descrição de todos os métodos e técnicas usados na rotina do laboratório.

***Expressão dos resultados*:** o resultado do exame parasitológico das fezes tem como objetivo cinco propósitos principais: a) fornecer informações úteis ao diagnóstico; b) servir como guia para o tratamento; c) acompanhar e determinar a eficiência do tratamento; d) trazer informações de valor para estudos epidemiológicos; e e) fornecer os elementos básicos para corrigir as deficiências nos programas de profilaxia do meio ambiente.

Forma correta de expressar os resultados positivos no exame parasitológico das fezes:

a. Todos os parasitos patogênicos ou não-patogênicos devem ser reportados nos seus nomes científicos, dando ênfase ao estágio de diagnóstico identificado.

b. Os nomes das espécies seguem a nomenclatura binária, sendo formados por um nome genérico e um nome específico. Os nomes científicos são sempre grifados, ou escritos em itálico ou em negrito.

c. Geralmente os protozoários e os helmintos não são quantificados. Entretanto, o estágio de diagnóstico específico (por exemplo: trofozoítos, cistos, oocistos, esporos, ovos e larvas) deve ser indicado.

d. Exceções quanto à quantificação seriam para o *Blastocystis hominis* (existe uma associação entre o número e os sintomas) e o *Trichuris trichiura* (Tabela 32.1) (Ver Capítulo 5)[17].

e. Cristais de Charcot-Leyden devem ser informados e quantificados.

f. Quando os espécimes são frescos, ou recentemente preservados, as leveduras devem ser mencionadas e quantificadas.

Observações sobre os diferentes procedimentos de diagnóstico: dois pontos devem ser considerados na escolha de uma técnica para trabalhos de diagnóstico ou para programas de CQ: a) a técnica escolhida não necessita ser a mais exata entre as existentes, mas o seu grau de confiança deve ser conhecido, tendo sido o mesmo determinado pelo pessoal técnico; e b) a escolha da técnica deve ser feita pelo pessoal do laboratório, considerando os critérios de exatidão e precisão. O pessoal técnico deve estar familiarizado com diferentes métodos e técnicas, além de conhecer suas vantagens e desvantagens.

***Limitações dos métodos e das técnicas empregadas*:** as limitações dos procedimentos relacionados com a precisão e acuidade, como também as substâncias interferentes e possíveis fontes de erro, devem ser descritas minuciosamente.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

***Referências e bibliografia*:** todas as referências e bibliografia usadas para escrever os procedimentos devem ser relacionadas no fim de cada método e/ou técnica, proporcionando ao pessoal técnico informações adicionais.

Qualificação do Pessoal Técnico

O pessoal que trabalha na área do diagnóstico parasitológico deve ter experiência suficiente, treinamento especializado e supervisão adequada, como também ter condições de reconhecer e identificar os estágios de diagnóstico dos parasitos humanos mais comuns. Estar completamente familiarizado com os procedimentos técnicos de colheita e de preservação da(s) amostra(s), como também dos métodos e das técnicas de exame dos espécimes submetidos rotineiramente ao laboratório. Cada laboratório deve desenvolver uma coleção de material de referência na forma de esfregaços fecais corados, fezes preservadas em formaldeído e esfregaços sangüíneos corados, que podem ser consultados para auto-estudo e para propósitos de determinação da qualidade do exame realizado[23,29].

Equipamento

O equipamento[17,20,23] usado no laboratório de diagnóstico em Parasitologia inclui: microscópio óptico, lupa estereoscópica, capelas de fluxo laminar vertical e/ou horizontal, centrífuga, estufa, banho de água, refrigerador, congelador, autoclave, destilador, lavador de pipetas, forno de microondas, os quais devem estar em perfeito estado de funcionamento. O laboratório deve adotar rotina de manutenção dentro do controle de qualidade interno, para monitorar o desempenho de cada equipamento, sua rotina de manutenção preventiva e corretiva conforme as especificações dos fabricantes. A temperatura dos refrigeradores, congeladores, estufas e fornos deve ser controlada diariamente, em particular a temperatura das estufas, que é crítica.

Tabela 32.1
Quantificação dos Organismos[a]

	Quantificação	
Categoria	*Protozoários*	*Helmintos*
Raros	2-5/pl[b]	2-5/pl[c]
Poucos	1/5-10plga	1/5-10plpa
Moderados	1-2/plga a 1/2-3plga	1-2/plpa
Muitos	Vários/plga	Vários/plpa

[a] Essa quantificação (baseada em lamínula 22 x 22mm) é usada pelo Centers for Disease Control and Prevention Proficiency Testing Program (EUA), Microbiology-Parasitology, 1985 (Garcia e Bruckner)[17],
Abreviações: pl = pesquisa em lamínula de 22 x 22mm; plga = pesquisa total do campo microscópico (aumento, 400X); plpa = pesquisa total do campo microscópico com pequeno aumento (100X).
[b] Pesquisa total do campo microscópico com grande aumento (400X).
[c] Pesquisa total do campo microscópico com pequeno aumento (100X).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Manter relatório acurado e permanente, no que diz respeito ao funcionamento do ar comprimido, do botijão criobiológico (com nitrogênio líquido) e das estufas para cultivo em anaerobiose. As centrífugas devem ser periodicamente limpas e inspecionadas para fornecerem o máximo em *performance*. Os procedimentos parasitológicos usam centrífugas horizontais e de mesa. Centrífugas com rotores em ângulo não são indicadas para os procedimentos de flutuação e sedimentação das fezes. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular. O refrigerador deve se manter às temperaturas de 4°C a 5°C. O laboratório deve possuir exaustores para renovar o ar do ambiente e exaurir os vapores tóxicos dos produtos químicos e das soluções. A capela de fluxo laminar vertical ou horizontal deve ser usada para criar uma área de trabalho estéril na qual é possível proteger os materiais vulneráveis à contaminação do ar. As capelas de fluxo laminar são indicadas para o preparo de meios de cultura, preparo e enchimento de soluções e produtos estéreis e testes de esterilidade. A manutenção da capela biológica de fluxo laminar vertical deve ser realizada pelo fabricante dentro das especificações do manual de operações (Ver Capítulo 33).

Morfometria Feita com Micrômetro Ocular

Ver Capítulo 35 — Microscopia Óptica[1,16,18]

PROTOZOÁRIOS E HELMINTOS INTESTINAIS

Colheita da Amostra Fecal

A detecção e a identificação dos parasitos intestinais estão em relação direta com a qualidade da amostra entregue ao laboratório. Na colheita dos espécimes fecais, vários fatores devem ser considerados: tipo do recipiente, volume, idade da amostra, as drogas e os compostos químicos que podem interferir na realização do exame. O paciente deve receber instruções impressas para facilitar a colheita das fezes. Cada amostra deverá apresentar no mínimo as seguintes informações: nome do paciente, número de identificação, nome do médico, data e horário da colheita, a qual deverá ser acompanhada de uma requisição médica, indicando o procedimento laboratorial a ser seguido. O número de amostras necessárias para a demonstração de parasitos intestinais varia de acordo com: a qualidade dos espécimes submetidos ao estudo, a exatidão das análises realizadas e a gravidade da infecção. Não existe uma uniformidade de conduta relacionada com o limite máximo na quantidade da amostra que deve ser colhida. Todo o bolo fecal deve ser enviado ao laboratório; caso esse procedimento não possa ser cumprido, uma quantidade mínima de 20 a 30g (ou a quantidade de uma colher das de chá) pode ser empregada na análise. Pequenas quantidades podem ser examinadas, mas o espécime provavelmente pode secar antes do exame. A amostra seca na superfície e nas bordas deve ser rejeitada[3,9,10,15,17].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Solução Salina

Preparar a solução misturando o cloreto de sódio (NaCl) com a água destilada-deionizada. A solução salina a 0,85% estocada em frasco de vidro com tampa esmerilhada deve ser transferida diariamente ao frasco conta-gotas e controlada para a presença de organismos de vida livre, especialmente flagelados e ciliados. O procedimento usual para controle é colocar uma ou duas gotas da solução salina em uma lâmina de microscopia, cobrindo a preparação com uma lamínula. A preparação no microscópio deve ser examinada cuidadosamente. A contaminação pode resultar da acidental remoção de pequena porção de fezes durante a preparação da montagem salina. Para evitar essa contaminação, colocar primeiro a solução salina na lâmina[15].

Reagentes, Corantes e Outras Soluções

A qualidade e a confiança dos corantes, preservadores e outros reagentes usados são de grande importância no diagnóstico laboratorial. Todas as soluções devem ser adequadamente rotuladas com uma clara e legível descrição do conteúdo, data de preparação (ou quando foi comercialmente comprado, marcar a data do recebimento) e data de validade. Deve ser acrescentada no rótulo a data quando o CQ foi realizado. O rótulo dos reagentes contendo veneno, como os fixadores de Schaudinn e álcool polivinílico (fixador APV), deverá ser claramente identificado como VENENO[15].

Exame Direto a Fresco

O exame direto a fresco[13,15] é um procedimento simples e eficiente para o estudo das fezes, permitindo observar os trofozoítos vivos dos protozoários. Esse procedimento coprológico jamais deve ser omitido. As preparações a fresco são obtidas diretamente dos espécimes fecais e requerem o mínimo de material (2mg) para cada método de exame. Todos os estágios de diagnóstico dos organismos, pelo uso de diferentes soluções, podem ser determinados e identificados. Os esfregaços com fezes frescas e não fixadas são rotineiramente preparados com as soluções salina a 0,85% e de iodo.

1. Deve ser verificado diariamente se a solução salina a 0,85%, a solução de iodo e a solução de azul-de-metileno de Nair estão transparentes e não contaminadas por bactérias ou fungos.

2. A solução de iodo deve apresentar cor castanho-escuro (chá da Índia ou vinho do Porto), mostrando correta intensidade de contraste. Desprezar as soluções fracas.

3. Nos cistos dos protozoários, corretamente corados pela solução de iodo, o glicogênio, se presente, exibe uma coloração castanho-avermelhada, o citoplasma cora-se em amarelo e a cromatina periférica dos núcleos, em preto ou marrom. As características dos núcleos são bem distintas, enquanto os corpos cromatóides são pouco visíveis.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

4. Leucócitos humanos misturados com fezes negativas podem ser usados como CQ da amostra fecal. Os leucócitos coram-se com a mesma coloração dos protozoários. O citoplasma dos leucócitos apresenta coloração amarelo-ouro.

5. Pela solução tamponada de azul-de-metileno o citoplasma dos trofozoítos das amebas cora-se em azul-claro e o núcleo, em azul-escuro. O núcleo corado apresenta as mesmas características morfológicas observadas nas colorações permanentes pela hematoxilina férrica.

6. Uma amostra sabidamente positiva também pode ser utilizada para CQ. A amostra para CQ deve ser examinada ao menos trimestralmente ou sempre que for preparado um novo corante.

7. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

8. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle".

Preservadores

Os preservadores[10,15] devem ser controlados com freqüência para assegurar se as soluções preservadoras efetivamente preservam os espécimes fecais. Os fixadores álcool polivinílico (fixador APV) e o líquido de Schaudinn devem ser testados durante a preparação de esfregaços permanentes para conferir se amostras de células mantêm suas características morfológicas. As rotinas abaixo descritas devem ser seguidas no CQ do líquido de Schaudinn, do fixador APV, do fixador álcool polivinílico modificado (fixador APV modificado), do fixador acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF) ou do fixador mertiolato-iodo-formaldeído (MIF).

1. Colher sangue venoso em tubo de centrífuga de 15ml contendo EDTA (usar sangue com alta contagem de leucócitos). Agitar com cuidado. Centrifugar (300 x *g* por dois minutos) e remover a camada de leucócitos.

2. Misturar os leucócitos com aproximadamente 2 a 4g de fezes frescas pastosas. Agitar com cuidado.

3. Colocar em lâmina de microscopia, perto de uma das extremidades, uma gota da mistura fezes-leucócitos. Com outra lâmina, estirar a mistura da direita para a esquerda, em direção ao lado oposto. Preparar vários esfregaços e mergulhar imediatamente na solução fixadora de Schaudinn. Com a finalidade de garantir melhor fixação, as lâminas são colocadas na solução fixadora de Schaudinn com a face do esfregaço virada para baixo. Cubas de *Coplin* podem ser usadas nessa fase do processo de coloração.

4. Misturar o restante das fezes-sedimento sangüíneo com 10ml dos fixadores APV, APV modificado, SAF ou MIF.

5. Deixar 30 minutos em contato com os preservadores, após preparar os esfregaços. Deixar secar durante 30 minutos à temperatura ambiente ou 30 a 60 minutos a 35°C.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

6. Para a identificação dos trofozoítos e cistos de protozoários, corar os esfregaços pelas colorações permanentes usadas na rotina do laboratório.

7. Após a coloração, se os leucócitos estiverem bem fixados e apresentarem morfologia e coloração típica, os protozoários intestinais fixados no mesmo lote da solução fixadora serão perfeitamente preservados, mostrando que a amostra fecal estava fresca e fixada dentro das recomendações dos limites de tempo.

8. A amostra usada para o CQ pode ser concentrada pelos procedimentos de rotina. Quando o preservador é misturado corretamente com as fezes, os leucócitos são visíveis no sedimento concentrado ou na superfície da película (depende da técnica usada).

9. Quando a morfologia dos leucócitos não confirmar uma boa fixação, descrever os resultados e indicar quais os procedimentos de correção que devem ser usados (repetir o teste e preparar um novo preservador).

10. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle".

Fixador de Schaudinn[10,17]

1. Colher sangue venoso em tubo de centrífuga contendo EDTA (usar sangue com alta contagem de leucócitos). Agitar com cuidado.

2. Centrifugar (300 x *g* por dois minutos) e remover a camada de leucócitos.

3. Misturar os leucócitos com aproximadamente 2 a 4g de fezes frescas pastosas. Agitar com cuidado.

4. Colocar em lâmina de microscopia, perto de uma das extremidades, uma gota da mistura fezes-leucócitos. Com outra lâmina, estirar a mistura da direita para a esquerda, em direção ao lado oposto. Preparar vários esfregaços e mergulhar imediatamente na solução fixadora de Schaudinn. Com a finalidade de garantir melhor fixação, as lâminas são colocadas na solução fixadora de Shaudinn com a face do esfregaço virada para baixo, ou cubas de *Coplin* podem ser usadas nessa fase do processo de coloração.

5. Após a coloração, se os leucócitos estiverem bem fixados, apresentando morfologia típica, todos os protozoários intestinais fixados no mesmo lote do fixador de Schaudinn serão muito bem fixados, mostrando que a amostra fecal estava fresca e fixada dentro dos limites recomendados de tempo.

6. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle".

Fixador Álcool Polivinílico (Fixador APV)[10,17]

1. Misturar aproximadamente 2g de fezes frescas pastosas com 10ml do fixador APV (solução pronta para o uso).

2. Adicionar várias gotas de sedimento de leucócitos (como foi descrito no fixador de Schaudinn) à mistura do fixador APV-fezes.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

3. Depois de 30 minutos de fixação, colocar em lâmina de microscopia, perto de uma das extremidades, uma gota do material (mistura de fezes-fixador APV-leucócitos). Com outra lâmina, estirar a mistura da direita para a esquerda, em direção ao lado oposto. Deixar secar (60 minutos à temperatura ambiente e 30 minutos a 35°C) e corar.

4. Após a coloração, se os leucócitos estiverem bem fixados, apresentando morfologia típica, todos os protozoários intestinais fixados no mesmo lote do fixador APV serão muito bem fixados, mostrando que a amostra fecal estava fresca e fixada dentro dos limites recomendados de tempo.

5. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle".

Colorações Temporárias

Soluções de Iodo

A solução de iodo muito concentrada é absorvida tão rapidamente, que os cistos tomam uma coloração uniforme marrom-escura. Entretanto, quando a concentração dessa solução é muito baixa, a solução não é suficientemente absorvida e os cistos tendem a harmonizar na sua periferia um matiz imperceptível junto a uma coloração de fundo amarelo-limão. Nos corantes velhos, existe uma tendência de evaporação do iodo. Além disso, se uma gota do corante é colocada e deixada em uma lâmina de microscopia por longo tempo, antes de as fezes serem emulsificadas com a solução corante, o resultado é uma coloração irregular ou uma supracoloração. Preparar novas soluções depois de 10 a 14 dias. Evitar a contaminação do frasco contagotas[9,15,17].

Colorações Permanentes

As colorações permanentes são usadas para a identificação de trofozoítos, ocasionalmente de cistos e para a confirmação das espécies. Cada método de coloração deverá seguir a seguinte rotina: a) os tempos das diferentes fases da coloração e da descoloração devem ser cuidadosamente controlados; b) os esfregaços sempre deverão ser drenados entre uma solução e outra. Quando uma lâmina é removida de uma solução, contatar a extremidade em papel-toalha, durante dois a quatro segundos para remover o excesso do líquido. Após, continuar a coloração. Esse procedimento é obrigatório para evitar que as soluções se tornem contaminadas com material líquido anterior e propiciar no final uma coloração de difícil observação; c) as cubas de *Coplin* deverão ser usadas em todas as fases do processo de coloração; manter as cubas fechadas para evitar a evaporação dos reagentes; d) tricrômico e *Chlorazol black* E são corantes estáveis, mas devem ser substituídos quando as colorações apresentam problemas na identificação dos organismos; e) as soluções corantes devem ser substituídas dentro das necessidades. O tempo exato para a substituição do corante depende da técnica e da freqüência do uso; f) estocar as soluções em frasco de vidro com

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

tampa esmerilhada. As soluções diferenciadoras e clarificadoras, como os álcoois, carbol-xilol (fenol-xilol) e xilol devem ser estocadas em frasco hermético, para evitar a hidratação. O total fechamento da tampa das cubas de *Coplin* é obtido com o uso de lubrificantes; g) o corante deve ser controlado após nova preparação (ou quando um novo número de lote é comprado); h) os métodos de coloração permanentes devem ser controlados semanalmente com amostras positivas e registrados todos os resultados do CQ; i) quando amostras positivas não estão disponíveis, usar fezes contendo células epiteliais ou pus; j) no momento do uso e periodicamente, a qualidade de coloração dos corantes deve ser controlada para parasitos do sangue; k) quando preparações sangüíneas positivas não estão disponíveis, usar esfregaços negativos; e l) introduzir, previamente, espécimes identificados como amostras positivas para estimar a performance total do laboratório de Parasitologia. O uso dessas amostras é de importância vital para os laboratórios que processam poucas amostras e para aqueles que recebem poucos espécimes positivos[3,5,15,17,27,29].

Colorações Derivadas da Hematoxilina[8,15,17]

1. Ver CQ dos fixadores de Schaudinn, APV e SAF.

2. Os espécimes fecais usados para o CQ podem ser igualmente fezes fixadas positivas para protozoários, ou negativas, preservadas pelo fixador APV, na qual foram adicionados leucócitos humanos. Os esfregaços preparados para o CQ de espécimes positivos fixados com APV, ou contendo leucócitos humanos, devem ser usados quando um novo lote do corante é preparado, ou no mínimo uma vez por semana. Culturas de protozoários podem também ser usadas.

3. O esfregaço para CQ deve ser incluído quando for usado um novo número de lote de reagente ou forem adicionados novos reagentes nas cubas de *Coplin*. Depois da lavagem das cubas, o procedimento deve ser repetido no mínimo semanalmente.

4. Quando o xilol estiver turvo ou houver uma acumulação de água no fundo das cubas de *Coplin*, deve ser usado novo etanol e xilol a 100%.

5. As cubas de *Coplin* devem ser mantidas fechadas para evitar a evaporação dos reagentes.

6. Dependendo do número de esfregaços corados, as soluções corantes básicas devem ser trocadas quando necessário.

7. Os organismos corados apresentam cor azulada ou cinzenta com estruturas nucleares pretas. Os corpos cromatóides dos cistos das amebas e inclusões, tais como bactérias ou hemácias no citoplasma dos trofozoítos, coram-se de preto. O material de fundo, usualmente, cora-se em azul-cinzento.

8. *Slides*, fotografias e livros de referência devem estar à disposição no laboratório de Parasitologia.

9. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. Colocar as objetivas e as oculares originais no microscópio durante a calibração. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

10. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle".

Colorações pelo Tricrômico[15,17,19]

1. Ver o CQ dos fixadores de Schaudinn, APV e SAF.

2. Os espécimes fecais usados para o CQ podem ser igualmente fezes fixadas positivas para protozoários ou negativas preservadas pelo fixador APV, nas quais foram adicionados leucócitos humanos. Os esfregaços preparados para o CQ de espécimes positivos fixados com APV, ou contendo leucócitos devem ser usados quando um novo corante é preparado, ou no mínimo uma vez por semana. Culturas de protozoários também podem ser usadas.

3. O esfregaço para CQ deve ser incluído quando for usado um novo número de lote do reagente ou forem adicionados novos reagentes nas cubas de *Coplin*. Depois da lavagem das cubas o procedimento deve ser repetido no mínimo semanalmente.

4. Quando o xilol estiver turvo ou houver uma acumulação de água no fundo das cubas de *Coplin*, usar novo etanol e xilol a 100%.

5. As cubas de *Coplin* devem ser mantidas fechadas para evitar a evaporação dos reagentes.

6. Dependendo do número de esfregaços corados, as soluções corantes básicas devem ser trocadas quando necessário.

7. O citoplasma dos cistos e trofozoítos realmente fixados e bem corados tomam a cor verde-azulado, com um matiz purpúreo. Ocasionalmente, os cistos da *E. coli* podem apresentar uma coloração mais levemente púrpura do que os cistos das outras espécies. A cromatina nuclear, corpos cromatóides, células vermelhas e bactérias coram-se de vermelho ou púrpura-escuro. As outras partículas, como leveduras e fungos, geralmente adquirem um matiz verde, mas freqüentemente ocorrem reações na gradação de cores das partículas ingeridas. O material de fundo usualmente cora-se em verde, contrastando, portanto, com os protozoários. O contraste é mais evidente do que o obtido com a coloração pela hematoxilina férrica, o qual tende a corar o material em verde-cinza.

8. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

9. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle".

10. *Slides*, fotografias e livros de referência devem estar à disposição no laboratório de Parasitologia.

Colorações Específicas para Coccídios

Métodos de Coloração Henriksen-Pohlenz; Kinyoun modificado (a frio); Ziehl-Neelsen modificado (a quente); Safranina (a quente) e Ziehl-Neelsen modificado (DMSO)[15,17,23,27].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

1. Incluir ao método de coloração uma lâmina controle com *Cryptosporidium parvum*, preparada com amostra fecal preservada pela solução salina de formaldeído a 10%. Quando os oocistos do *C. parvum* (4-5μm) apresentarem uma boa coloração, os organismos *I. belli* (20-30μm x 10-19μm) e *Cyclospora cayetanensis* (8-9μm) também tomarão o corante.

2. Quando o esfregaço foi perfeitamente fixado e a coloração realizada corretamente os oocistos do *C. parvum* e da *I. belli* apresentam coloração do rosa ao vermelho, ao púrpura intenso. Alguns dos quatro esporozoítos podem ser vistos nos oocistos do *Crytosporidium*. Os oocistos imaturos da *Isospora* aparecem corados, enquanto os oocistos maduros mostram os dois esporocistos corados, usualmente do rosa ao púrpura, com uma zona clara entre os esporocistos corados e a parede do oocisto. O fundo da preparação é corado em azul. Os organismos presentes freqüentemente apresentam, entre eles, uma intensidade de cor variável. Os oocistos de *Cyclospora cayetanensis* assemelham-se aos do *C. parvum*, os oocistos não apresentam morfologia interna bem definida e a intensidade de cor tende a ser mais variável do que aquela vista no *Cryptosporidium* e na *Isospora*.

3. Conferir a aderência (macroscopicamente) dos espécimes à lâmina.

4. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

5. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle".

Colorações Específicas para Microsporídios

Métodos de Weber e Ryan[15,17]

1. A única maneira de realizar CQ aceitável para esses métodos é usar esporos verdadeiros como controle dos organismos. Na maioria das vezes, a obtenção do controle positivo é muito difícil. O uso dos microrganismos é particularmente importante porque os esporos são dificilmente corados e muito pequenos (1 a 1,5μm).

2. Os esfregaços para CQ devem ser incluídos em todos os procedimentos de coloração, particularmente quando não são realizadas colorações com freqüência.

3. Usar no procedimento de coloração a cuba de *Coplin* para evitar a evaporação das soluções.

4. Conferir a aderência (macroscopicamente) dos espécimes à lâmina.

5. Quando os esfregaços foram corretamente fixados e corados, os esporos aparecem ovóides e refráteis, com a parede corada do rosa ao vermelho, com uma zona central clara ou, eventualmente, mostrando uma faixa horizontal ou em diagonal, a qual representa o túbulo polar.

6. As bactérias, células de leveduras e alguns artefatos coram-se de verde (Weber-verde) ou azul (Ryan-azul). Entretanto, algumas bactérias e artefatos coram-se de rosa-vermelho.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

7. Os resultados desse método de coloração deverão ser reportados somente se o esfregaço controle estiver bem corado.

Técnicas de Concentração

As técnicas de concentração figuram entre os procedimentos de rotina, como parte de um exame completo das fezes, para a pesquisa de parasitos e o diagnóstico de um pequeno número de organismos que foram omitidos, quando for usado somente o exame direto a fresco[3,13,15,17].

Técnicas de Flutuação

As técnicas de flutuação fundamentam-se no princípio da diferença de densidade específica entre os ovos de helmintos, cistos e oocistos de protozoários e o material fecal, a fim de que esses organismos flutuem na superfície dos reagentes com densidade específica. A densidade específica dessas soluções saturadas varia de 1,18 a 1,26g/ml, devendo ser controlada antes do uso.

1. Verificar os reagentes sempre que forem usados. A solução salina e a solução de sulfato de zinco devem apresentar aparência clara sem contaminação visível.

2. Trimestralmente ou sempre que a centrífuga for calibrada, amostras fecais sabidamente positivas devem ser concentradas e os organismos identificados.

3. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

4. A densidade da solução de sulfato de zinco é crítica, devendo ser ajustada com densitômetro pela adição de sal ou água.

5. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados “fora de controle”.

Centrífugo-Flutuação em Solução de Sacarose[3,14,15,17]

1. Verificar os reagentes sempre que forem usados. A solução de sacarose de Sheather deve apresentar aparência clara sem nenhuma contaminação visível.

2. Trimestralmente ou sempre que a centrífuga for calibrada, amostras fecais sabidamente positivas devem ser concentradas e os organismos identificados.

3. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

4. A densidade da solução de sacarose é crítica, devendo ser ajustada com densitômetro pela adição de sal ou água.

5. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle".

Técnicas de Sedimentação[3,14,15,17]

Os dois principais objetivos das técnicas de sedimentação são o aumento do número de ovos operculados, não operculados, larvas ou cistos e a separação das gorduras e óleos da maioria dos detritos. Nessas técnicas, os organismos são sedimentados igualmente pela gravidade ou centrifugação. O formaldeído e o éter não necessitam de um controle específico, a não ser os cuidados referentes ao armazenamento e transporte do éter.

1. Verificar os reagentes sempre que forem usados. A formalina e a solução salina devem apresentar aparência clara sem nenhuma contaminação visível.

2. Trimestralmente ou sempre que a centrífuga for calibrada, amostras fecais sabidamente positivas devem ser concentradas e os organismos identificados.

3. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

4. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle".

Isolamento e Cultura de Larvas de Nematóides

As larvas de *Strongyloides stercoralis* são usualmente as únicas larvas encontradas nos espécimes fecais. Dependendo dos movimentos de trânsito do intestino e das condições do paciente, larvas rabdiformes, e raramente larvas filariformes, poderão estar presentes. Quando houver demora na realização do exame parasitológico das fezes, poderão ser identificados e diagnosticados ovos embrionados e larvas de ancilostomídeos[15,17,24-26].

Métodos de Baermann e Morais; Rugai, Mattos e Brisola; Harada & Mori; Arakaki-Koga e Little[15]

1. Para obter excelentes resultados com os métodos, seguir os procedimentos de colheita e de transporte dos espécimes fecais para o exame parasitológico.

2. Examinar, quando possível, amostras positivas e negativas de fezes (de animais de laboratório) para ter certeza de que o procedimento utilizado é preciso.

3. Rever diagramas de larvas para confirmar a identificação.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

4. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

5. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário seguir o plano de ação para resultados "fora de controle".

Pesquisa de *Enterobius vermicularis*

A maioria dos autores afirma que as fêmeas grávidas não realizam ovoposição. Os ovos são libertados pelo rompimento (ação mecânica) ou dessecação do parasito. Diferentes autores relataram que os ovos são detectados nas fezes em não mais de 5% dos indivíduos infectados. Como os ovos são depositados fora do corpo, na região perianal, o diagnóstico é realizado através dos *swabs* anais[3,11,15,17].

Métodos da Fita de Celofane Adesiva e Transparente ou do *Swab* de Vaselina e Parafina (VASPAR)[15]

1. O laboratório deverá manter lâminas permanentes com ovos e vermes adultos de *E. vermicularis* para comparar a morfologia. Desenhos e fotografias do parasito deverão, também, estar à disposição do pessoal técnico para que possa ser estabelecida a comparação com os espécimes clínicos.

2. Participar de programas de controle de qualidade que incluam parasitos desconhecidos.

3. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. Colocar as objetivas e as oculares originais no microscópio durante a calibração. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

4. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle".

Método da Cápsula Duodenal (*Entero Test*®)

A técnica da cápsula duodenal (*Entero Test*®) é um novo procedimento para a colheita do conteúdo duodenal, com o máximo de simplicidade e o mínimo de desconforto para o paciente[12,17].

1. Verificar o CQ do líquido de Schaudinn, fixador APV e formalina a 10%.

2. Controlar semanalmente os preservadores ou quando for usado um novo número de lote dos reagentes. Os preservadores devem estar claros sem contaminação visível. Para testar a eficácia dos preservadores, usar fezes frescas positivas para protozoários ou negativas para parasitos misturados com leucócitos. Cultura de protozoários também pode ser empregada no CQ.

3. O microscópio deve estar calibrado. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

4. *Slides* coloridos, fotografias e livros de referência devem estar à disposição no laboratório de Parasitologia.

5. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

6. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle".

PARASITOS DO SANGUE E DOS TECIDOS

Esfregaços Estirado e Espesso

Os esfregaços estirados são geralmente empregados para o estudo das hemácias, contagem diferencial dos leucócitos, para diagnóstico e estudo diferencial dos diferentes estágios de diagnóstico das espécies de *Plasmodium.* Os esfregaços espessos são preparações sangüíneas que usam quantidades relativamente grandes de sangue em pequena área, a qual é desemoglobinizada para oferecer melhores resultados ao exame microscópico[5,15,17,22].

1. O esfregaço estirado deve ter no mínimo 2cm de comprimento, ocupando a área central da lâmina e com as margens livres de ambos os lados.

2. O esfregaço espesso deve ser de arredondado a oval com aproximadamente 2cm de área, ocupando obliquamente uma extremidade da lâmina.

3. Os esfregaços não devem apresentar áreas claras ou manchas (indicativo de gordura ou impressão digital na lâmina de microscopia).

4. Excesso de corante no esfregaço poderá confundir e tornar difícil a identificação do organismo.

Coloração de Giemsa[5]

A coloração de Giemsa é usada para diferenciar a morfologia nuclear e/ou citoplasmática, das plaquetas, dos eritrócitos, dos leucócitos e dos parasitos. Esse método é indicado para a coloração de esfregaços estirados, que são fixados com álcool metílico, e para esfregaços espessos, que não requerem fixação. A diluição da solução concentrada de Giemsa, para o uso, em solução tampão de fosfato, pH 7,2 ou 6,6-7,2, depende do método específico usado.

1. As soluções tampão de fosfatos e água tamponada devem estar claras sem contaminação visível.

2. Antes do uso, controlar a solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato, pH 7,2, incluindo o tampão de fosfatos e água tamponada.

3. Preparar e corar esfregaços de sangue humano normal e avaliar microscopicamente as reações de coloração das plaquetas, eritrócitos e leucócitos.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

a. Macroscopicamente, os esfregaços de sangue apresentam a coloração purpúrea. Quando apresentarem a cor azul, a água tamponada está muito alcalina; e quando mostrarem cor rosa ao vermelho a água tamponada está muito ácida.

b. Microscopicamente, os eritrócitos coram-se em rosa-pálido, as plaquetas em rosa forte e o núcleo dos leucócitos, em púrpura-azul, com citoplasma mais claro. Os grânulos dos eosinófilos coram-se em brilhante púrpura-vermelho, os grânulos dos neutrófilos em púrpura e as granulações dos basófilos em azul.

4. O microscópio deve ser calibrado a cada 12 meses. As objetivas e as oculares empregadas na calibração devem ser usadas em todas as medidas realizadas com o microscópio.

5. Os resultados do CQ devem ser apropriadamente registrados.

Coloração pela Hematoxilina de Delafield[4,15,17]

A coloração da hematoxilina de Delafield é empregada na demonstração dos detalhes estruturais das microfilárias. O corante realça especialmente, quando presente, os núcleos e a bainha. Nenhum corante, entretanto, revela todas as características morfológicas e em muitos casos mais de um procedimento de coloração pode ser necessário para a identificação das espécies. Esfregaços sangüíneos espessos ou esfregaços estirados, preparados com sangue concentrado, corados pela hematoxilina de Delafield, são usados para o diagnóstico dos estágios embrionários das filárias.

1. Quando possível, controlar todo o procedimento de coloração antes de usar o corante para o diagnóstico da filariose no sangue.

2. Caso o laboratório não possua sangue humano infectado com microfilárias, usar sangue canino com *Dirofilaria immitis* como controle. Essa microfilária não possui bainha, mas apresenta núcleos bem distintos. A coloração das estruturas está descrita adiante.

3. Quando sangue positivo não estiver disponível para o controle, seguir com todo o cuidado o procedimento de coloração dos espécimes enviados ao diagnóstico.

a. Macroscopicamente, os esfregaços apresentam coloração púrpura-azulado.

b. Microscopicamente, os núcleos das microfilárias coram-se em azul ou púrpura e a bainha, se presente, em púrpura-claro. O citoplasma apresenta coloração avermelhada. As células R, o poro excretor e as células embrionárias, quando visíveis, não diferem em coloração dos núcleos caudais. O corpo central é visto como uma estrutura esbranquiçada.

4. Calibrar o microscópio a cada 12 meses; as objetivas e as oculares empregadas na calibração devem ser usadas em todas as medidas realizadas com o microscópio. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

5. Os resultados do CQ devem ser registrados.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Observações

1. Nos esfregaços estirados, corados pelo método de Giemsa, as formas amastigotas da *Leishmania donovani* são encontradas "dentro dos monócitos". O material nuclear cora-se de vermelho-púrpura-escuro, o citoplasma em azul-claro e o cinetoplasto, quando presente, em azulado-purpúreo.

2. As formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* com localização extracelular (móveis no exame direto a fresco), coradas pelo método de Giemsa, apresentam reações de coloração semelhantes à da *L. donovani*, mostrando um visível cinetoplasto.

3. O material nuclear dos estágios de evolução do *Plasmodium* cora-se do vermelho ao vermelho-púrpura e o citoplasma, em azul-claro. As granulações de Schüffner e outras inclusões dos leucócitos infectados coram-se em vermelho.

4. As microfilárias podem ser encontradas no exame direto a fresco.

5. Quando coradas pelo método de Giemsa, mostram a célula excretora e a embrionária em azul-celeste, a célula R, o poro excretor e o anal em rosa-avermelhado e a bainha, quando presente, em rosa-claro. Pela hematoxilina de Delafield, os núcleos caudais coram-se em azul ou púrpura, a bainha, quando presente, em púpura-claro e o citoplasma em avermelhado. As células excretora e embrionária, quando visíveis, não diferem em coloração dos núcleos. O corpo central é visto como uma estrutura esbranquiçada.

6. As colorações nucleares e citoplasmáticas dos parasitos da malária também são observadas nos tripanossomos e nas leishmanias intracelulares. A bainha das microfilárias pode ou não ser corada pelo método de Giemsa, enquanto o corpo é corado do azul ao púrpura.

Técnica de Knott[7,15,17]

A técnica de concentração de Knott é indicada para a pesquisa de microfilárias quando a densidade desses parasitos é baixa.

1. Verificar a calibração da centrífuga.

2. Quando possível, controlar o procedimento de coloração, usando sangue humano ou de canino infectado com microfilárias embainhadas ou desembainhadas.

3. Quando sangue positivo não estiver disponível, seguir com todo o cuidado a técnica, testando os espécimes enviados ao diagnóstico. Examinar o sedimento com pequeno e grande aumento.

4. Calibrar o microscópio a cada 12 meses; as objetivas e as oculares empregadas na calibração devem ser usadas em todas as medidas realizadas com o microscópio. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

5. Os resultados do CQ devem ser registrados.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Método da Membrana Filtrante[6,15,17]

O método de concentração pela membrana-filtrante é muito sensível porque permite o exame de pequenos volumes de sangue periférico e a recuperação absoluta das microfilárias quando presentes em infecções leves.

1. Quando possível, controlar o procedimento de coloração, usando sangue humano ou de canino infectado com microfilárias.

2. Quando sangue positivo não estiver disponível, seguir com todo o cuidado a técnica, testando os espécimes enviados ao diagnóstico. Examinar o sedimento com pequeno e grande aumento.

3. Calibrar o microscópio a cada 12 meses; as objetivas e as oculares empregadas na calibração devem ser usadas em todas as medidas realizadas com o microscópio. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

4. Os resultados do CQ devem ser registrados.

EXAME DE OUTROS ESPÉCIMES DO TRATO INTESTINAL E SISTEMA UROGENITAL

Material de Sigmoidoscopia

O material obtido pela sigmoidoscopia trouxe a oportunidade de diagnosticar e monitorar o curso da amebíase e da esquistossomose por *Schistosoma mansoni*. Quando o exame de fezes for negativo para casos suspeitos de amebíase, as amostras poderão ser obtidas do intestino pela retossigmoidoscopia[17].

Exame Direto a Fresco

1. Verificar semanalmente se a solução salina e de iodo estão transparentes e não contaminadas por bactérias ou fungos. A solução de iodo deve conservar a cor castanho-escuro (chá-da-índia ou vinho do Porto), apresentando uma correta intensidade de contraste. Desprezar as soluções fracas.

2. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. As objetivas e as oculares originais devem ser colocadas no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com o micrômetro ocular.

3. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados “fora de controle”.

Esfregaços Permanentes Corados

1. As soluções salina e de iodo devem ser controladas diariamente no momento do uso. A solução salina deve estar clara, sem contaminação com bactérias e fungos; a solução de iodo não deve ser velha, devendo apresen-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

tar uma correta intensidade de contraste, conservando a cor castanho-escuro (chá-da-índia ou vinho do Porto), com cristais no fundo do frasco. Desprezar a solução que não apresentar essas características.

2. O fixador de Schaudinn deve estar claro e límpido, sem a flutuação de detritos ou cristais. O fixador pode ser usado quando alguns cristais precipitam no fundo da cuba de *Coplin.*

3. O fixador APV deve estar claro e límpido. O fixador pode ser usado quando alguns cristais precipitam no fundo da cuba de *Coplin.*

4. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. Colocar as objetivas e as oculares originais no microscópio durante a calibração. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular.

5. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados "fora de controle".

Pesquisa de *Trichomonas vaginalis*

O exame microscópico convencional de preparações a fresco e de esfregaços fixados e corados, junto com os métodos culturais, é o procedimento laboratorial mais comumente empregado no diagnóstico da tricomoníase urogenital[15,17].

Exame Direto a Fresco

1. Verificar diariamente os reagentes usados no exame direto a fresco.

2. A solução salina isotônica (0,15M) deve estar clara e sem contaminação visível.

3. A solução de iodo deve estar transparente e não contaminada por bactérias e fungos e conservar a cor castanho-escuro (chá-da-índia ou vinho do Porto), apresentando uma correta intensidade de contraste, com cristais no fundo do frasco. Desprezar a solução que não apresentar essas características.

4. A solução *vaginal identification of pathogens* (VIP) deve estar clara e sem contaminação visível.

5. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados no mínimo uma vez ao ano. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.

Coloração de Giemsa[5]

Esfregaços fixados do exsudato vaginal corados pelo método de Giemsa são usados exaustivamente para o diagnóstico do *T. vaginalis*.

1. Verificar diariamente os reagentes usados no exame direto a fresco.

2. A solução salina isotônica (0,15M) deve estar clara e sem contaminação visível.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

3. Preparar e corar um esfregaço sangüíneo estirado para controle de qualidade do corante de Giemsa.

4. Verificar diariamente se a solução tampão de fosfato pH 6,6-7,2 está clara, sem vestígios de contaminação e de precipitação. O pH deve ser testado antes da preparação do corante.

5. Rever o CQ do corante de Giemsa antes da pesquisa dos organismos.

6. Manter criopreservada a cultura padrão de *T. vaginalis* (ATCC 30.001). Cultivar semanalmente essa amostra. Corar uma lâmina preparada com a cultura padrão em paralelo com a lâmina do material colhido do paciente. Os resultados somente serão aceitos quando o controle de qualidade dos organismos da cultura padrão estiverem bem corados.

7. Calibrar o microscópio e realizar a morfometria com micrômetro ocular.

Escarro[17]

Escarro Expectorado: Exame Direto a Fresco e Preparações Permanentes Coradas

Os parasitos dos pulmões, organismos grandes e móveis, são detectados pelo exame direto a fresco. Os esfregaços são examinados com ou sem a adição da solução de iodo de lugol ou de D'Antoni. A coloração pelo tricrômico é usada para diferenciar a *E. histolytica* da *E. gingivalis* e a coloração de Giemsa é indicada para definir as formas larvárias dos nematóides. O *C. parvum* é dificilmente identificado através do exame direto a fresco, sendo a criptosporidiose pulmonar diagnosticada pelo emprego de esfregaços permanentes corados pelos derivados de Ziehl-Neelsen (métodos a quente e/ou a frio).

1. As soluções salina e de iodo devem ser controladas diariamente no momento do uso. A solução salina deve estar clara, sem evidente contaminação por bactérias e fungos. A solução de iodo não deve ser velha, devendo apresentar uma correta intensidade de contraste, conservando a cor castanho-escuro (chá-da-índia ou vinho do Porto). Desprezar a solução que não apresentar essas características.

2. A solução de hidróxido de sódio a 3% deve estar clara e livre de contaminação. Preparar nova solução de trabalho quando estiver turva.

3. Ver o CQ dos fixadores de Schaudinn, fixador APV e formaldeído a 10%.

4. Cada novo lote da solução do corante de Giemsa a 5% ou do tampão de fosfato, pH 7,2, deve ser controlado pela coloração de amostra sangüínea, na qual os glóbulos vermelhos apresentam cor cinzenta, enquanto o núcleo e o citoplasma dos leucócitos, a coloração vermelho-púrpura e azul, respectivamente.

5. O microscópio e a centrífuga devem ser calibrados a cada 12 meses.

6. Manter a temperatura do refrigerador em 4°C (variação: 2°C a 8°C), local onde a solução mucolítica de trabalho deve ser estocada.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

7. Estocar as soluções corantes no escuro e a solução concentrada de Giemsa em frasco de vidro com tampa esmerilhada. A fixação e a coloração são realizadas, usualmente, na cuba de *Coplin*. A solução corante de Giemsa deve ser preparada fresca diariamente.

8. Todos os dados obtidos no CQ devem ser registrados.

CULTIVO DE PROTOZOÁRIOS

TRICHOMONAS VAGINALIS

O cultivo é o método mais sensível de diagnóstico da tricomoníase; conseqüentemente, todo empenho deverá ser feito para que todas as amostras de pacientes sejam inoculadas em meios de cultura. A semente *T. vaginalis* (ATCC 30.001) deverá estar à disposição do laboratório quando são usadas culturas para o isolamento e diagnóstico dos espécimes clínicos[15,17].

1. Verificar os reagentes e os meios de cultura (pelo menos uma vez por semana). Todos os meios de cultura, inclusive a solução de Ringer, devem estar isentos de qualquer sinal de precipitação e contaminação por bactérias e/ou fungos.

2. Calibrar o microscópio e realizar a morfometria com micrômetro ocular.

3. Manter criopreservada a cultura padrão de *T. vaginalis* (ATCC 30.001).

a. Cultivar e repicar semanalmente a cepa padrão.

b. No mesmo momento em que os espécimes dos pacientes são inoculados, semear em um novo meio fresco a cepa padrão.

c. Quando os organismos dessa cultura se reproduzirem e se mantiverem viáveis por 96 horas, reportar os resultados da cultura do paciente.

4. Corar, pelo método de Giemsa, uma lâmina preparada com a cultura padrão, em paralelo com a lâmina do material colhido do paciente. Os resultados são aceitos somente quando o controle dos organismos estiver bem corado.

Observações: o método de cultivo necessita de três a quatro dias para o crescimento dos flagelados e, ocasionalmente, as amostras podem conter organismos não-viáveis. A realização simultânea do exame microscópico pelo exame direto a fresco e/ou de esfregaços corados (método de Giemsa) é de extrema importância. Quando os organismos são encontrados antes ou no fim de 96 horas, reportar a pesquisa como positiva (p. ex.: positivo para *Trichomonas vaginalis*). Quando os trofozoítos não são vistos depois de quatro dias de incubação, desprezar os tubos e reportar o resultado como negativo (p. ex.: negativo para *Trichomonas vaginalis*). Usar sempre o mesmo meio de cultura para o controle de qualidade e para a inoculação do espécime colhido do paciente.

ENTAMOEBA HISTOLYTICA

A *Entamoeba histolytica,* agente da amebíase intestinal e hepática, pode ser cultivada em conjunto com bactérias encontradas nas fezes dos pacien-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

tes infectados. Os seguintes organismos controle deverão estar à disposição do laboratório quando são usadas culturas para o isolamento e diagnóstico de espécimes clínicos: *Entamoeba histolytica* HU-1:CDC (ATCC 30.925), *Entamoeba histolytica* (ATCC HK-9) e *Entamoeba histolytica* tipo Laredo, cultivada a 35°C (ATCC 30.042)[17].

1. Controlar semanalmente e sempre que forem usadas as soluções tampão de fosfatos (PBS), suspensão de amido de arroz, solução de Tween 80 e os meios *Trypticase-Yeast Extract-Serum-Gastric Mucin* (TYSGM-9) e *Trypticase-Yeast Extract-Iron-Serum* (TYI-S-33).

a. Os meios não devem apresentar sinais de precipitação e nenhuma contaminação visível por bactérias e/ou fungos.

b. As soluções de PBS, Tween 80 e suspensão de amido de arroz devem estar claras, sem sinais visíveis de contaminação.

2. Manter as culturas padrões de *E. histolytica* a 35°C, ATCC 30.925 cepa HU-1:CDC) e ATCC 30.015 (cepa HK-9), e a cepa *E. histolytica* tipo *Laredo* (ATCC 30.042) *e E. moshkovskii* em cultura a 25°C.

a. Transferir a cultura padrão (ATCC 30.925) em dias alternados para o meio TYGM-9. Uma vez por mês, transferir e manter a cultura padrão a 25°C.

b. Transferir a cultura padrão (ATCC 30.015) uma vez a cada três dias para o meio TYIS-33.

c. Os trofozoítos em cultura medem de 10 a 60μm e geralmente apresentam um só núcleo visível nas formas vivas. O exame a fresco mostra formas pleomórficas ativas, alongadas, com emissão contínua e rápida de pseudópodes grossos e hialinos, os quais costumam imprimir movimentação direcional, parecendo deslizar na superfície. O núcleo é pequeno e usualmente com localização central, mas pode ser excêntrico. Os cistos não são usualmente encontrados nas culturas.

d. Os resultados do CQ devem ser registrados. Quando necessário, seguir plano de ação para resultados "fora de controle".

Observações: as culturas axênicas são usadas para a manutenção das cepas para o CQ e para propósitos de pesquisa.

Leishmania spp. e *Trypanosoma* (*S*) *cruzi*

Ver Capítulos 13, 14 e 23. Os seguintes organismos controle deverão estar à disposição do laboratório quando são usadas culturas para o isolamento e diagnóstico de espécimes clínicos: *L. mexicana* (ATCC 30.883) e *T. cruzi* (ATCC 30.160)[17].

1. Controlar semanalmente e sempre que forem usados os reagentes e os meios de cultura. Os meios não devem apresentar nenhum sinal de precipitação e contaminação visível por bactérias e/ou fungos.

2. O micrômetro ocular e o microscópico devem ser calibrados a cada 12 meses. Colocar as objetivas e as oculares originais no microscópio durante a calibração.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

3. Manutenção de culturas de *Leishmania* spp.

a. Transferir semanalmente as culturas padrões.

b. No mesmo momento em que os espécimes dos pacientes são inoculados, semear em um novo meio fresco a cepa padrão.

c. Corar, pelo método de Giemsa, uma lâmina preparada com a cultura padrão, em paralelo com a lâmina do material colhido do paciente. Os resultados são aceitos somente quando o controle dos organismos estiverem bem corados.

4. Todos os dados obtidos no CQ devem ser registrados.

Observações: o cultivo e o isolamento de organismos de material suspeito fornece um diagnóstico definitivo; entretanto, necessita de três a sete dias de incubação. A realização simultânea do exame microscópico pelo exame direto a fresco e/ou de esfregaços corados (método de Giemsa) é de extrema importância para viabilizar um rápido tratamento antes da positividade das culturas.

COLEÇÃO DE PARASITOS DE REFERÊNCIA

Protozoários Intestinais e Urogenitais[2]

Entamoeba histolytica, trofozoíto e cisto.
Entamoeba hartmanni, trofozoíto e cisto.
Entamoeba coli, trofozoíto e cisto.
Endolimax nana, trofozoíto e cisto.
Iodamoeba bütschlii, trofozoíto e cisto.
Blastocystis hominis, cisto.
Giardia lamblia, trofozoíto e cisto.
Chilomastix mesnili, trofozoíto e cisto.
Dientamoeba fragilis, trofozoíto.
Balantidium coli, trofozoíto e cisto.
Trichomonas hominis, trofozoíto.
Cryptosporidium parvum, oocisto (esfregaço permanente corado).
Cyclospora cayetanensis, oocisto (esfregaço permanente corado).
Isospora belli, oocisto (esfregaço permanente corado).
Enterocytozoon bieneusi, esporo (esfregaço permanente corado).
Encephalitozoon intestinalis, esporo (esfregaço permanente corado).
Trichomonas vaginalis, trofozoíto.

Protozoários do Sangue e dos Tecidos[2]

Plasmodium falciparum, esfregaço permanente corado.
Plasmodium malariae, esfregaço permanente corado.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Plasmodium vivax, esfregaço permanente corado.
Babesia spp., esfregaço permanente corado.
Complexo *Leishmania braziliensis*, esfregaço permanente corado.
Complexo *Leishmania donovani*, esfregaço permanente corado.
Trypanosoma (*S*) *cruzi*, esfregaço permanente corado.

Helmintos Intestinais[2]

Trichuris trichiura, ovo.
Capilaria philippinensis, ovo.
Enterobius vermicularis, ovo e verme adulto.
Ascaris lumbricoides, ovo e verme adulto.
Ancilostomídeos, ovo.
Strongyloides stercoralis, larva.
Trichostrongylus spp., ovo.
Hymenolepis nana, ovo.
Hymenolepis diminuta, ovo.
Taenia spp., ovo e verme adulto.

Helmintos do Sangue e dos Tecidos[2]

Wuchereria bancrofti, microfilária (esfregaço permanente corado).
Onchocerca volvulus, microfilária (esfregaço permanente corado).
Mansonella ozzardi, microfilária (esfregaço permanente corado).
Fasciola hepatica, ovo e verme adulto.

PARASITOS DA *AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION* (ATCC) PARA CONTROLE DE QUALIDADE

1. Culturas de 18 a 24 horas de *Escherichia coli e/*ou *Enterobacter aerogenes*.
2. *Acanthamoeba castellanii* — ATCC 30.010.
3. *Naegleria gruberi* — ATCC 30.133.
4. *Entamoeba histolytica* HU-1:CDC — ATCC 30.925.
5. *Entamoeba histolytica* HK-9 — ATCC 30.015.
6. *Trichomonas vaginalis* — ATCC 30.001.
7. *Leishmania mexicana* — ATCC 30.883.
8. *Trypanosoma cruzi* — ATCC 30.160.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO
CONTROLE DE QUALIDADE — REAGENTES

1. Nome do reagente: _____

2. Exigências do CQ (freqüência): _____

3. Critérios aceitáveis: _____

Controle negativo: _____

Controle positivo: _____

Data	Número do lote	Data do vencimento	Parasito CQ	Procedimento	Resultados: A/NA[1]	Observações Ação corretiva

Comentários:

_____

_____

Data	Número do lote	Data do vencimento	Parasito CQ	Procedimento	Resultados: A/NA[1]	Observações Ação corretiva

Comentários:

_____

_____

Data	Número do lote	Data do vencimento	Parasito CQ	Procedimento	Resultados: A/NA[1]	Observações Ação corretiva

Comentários:

_____

_____

[1]A = Aceito; NA = Não aceito.
(Fonte: Garcia, Bruckner; 1997).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO
CONTROLE DE QUALIDADE — EXAME CULTURAL

1. Nome do paciente: _____
2. Organismo a ser isolado: _____
3. Nome e número — Meio 1: _____
   Nome e número — Meio 2: _____
4. Freqüência: no mesmo momento em que os espécimes dos pacientes são inoculados, semear em um novo meio fresco a cepa padrão (não existem exceções nessa exigência).

Meio 1: _____

Data	Meio Número do lote	Data do vencimento	Procedimento	A[1]	NA[2]	Data da leitura	Observações Ação corretiva

Comentários:

_____

_____

Meio 2:_____

Data	Meio Número do lote	Data do vencimento	Procedimento	A[1]	NA[2]	Data da leitura	Observações Ação corretiva

Comentários:

_____

_____

1. Resultado Aceito (A): o organismo usado para o CQ cresceu (trofozoítos móveis), podendo ser detectado microscopicamente no meio usado para o CQ (inoculado com cepa padrão).
2. Resultado Não Aceito (NA): o organismo usado para o CQ não cresceu (trofozoítos móveis), não podendo ser detectado microscopicamente no meio usado para o CQ (inoculado com cepa padrão).
3. Observação: quando a cultura CQ é negativa, a cepa controle deverá ser novamente inoculada em um meio novo fresco.
(Adaptado de: Garcia, Bruckner; 1997).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO
CONTROLE DE QUALIDADE
MANUTENÇÃO DO EQUIPAMENTO

Descrição do equipamento: _____
(Incluir número de inventário)

Número de série: ____ Número do modelo: ____ Data da compra: _____

Localização do equipamento: _____

Manutenção necessária e idade do chassi:
(Listar as necessidades específicas — usar ficha para registrar a manutenção vigente)

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

Data e rubrica	Manutenção (Manutenção específica necessária)	Comentários Ação corretiva

(Adaptado: Garcia, Bruckner; 1997).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amato SB. In: De Carli GA. Diagnóstico Laboratorial das Parasitoses Humanas. Métodos e Técnicas. Rio de Janeiro: MEDSI, 259-268, 1994.
2. American Type Culture Collection (ATCC) Catalogue of Protists. 18th ed., Rockville, Maryland, EUA, 1993.
3. Ash LR, Oriehl TC. Parasites: A Guide to Laboratory. Procedures and Identification. Chicago (Ill): ASCP Press, 1991.
4. Bullock-Iacullo S. Giemsa Stain. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.8.4.1-7.8.4.6, v.2, 1992.
5. Bullock-Iacullo S. Delafield's Hematoxylin Stain. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.8.6.1-7.8.6.4, v.2, 1992.
6. Bullock-Iacullo S. Concentration Procedures: Buffy Coat Concentration. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.8.7.1-7.8.7.3, v.2, 1992.
7. Bullock-Iacullo S. Concentration Procedures: Knott Concentration. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.8.9.1-7.8.9.3, v.2, 1992.
8. Bruckner DA. Microscopic Examination of Fecal Specimens: Iron Hematoxylin Stain (Modified Spencer-Monroe). In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.3.7.1-7.3.7.5, v.2, 1992.
9. Carroll MJ. Collection and Preservation of Fecal Specimens: Collection of Fresh Specimens. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.2.1.1-7.2.1.2, v.2, 1992.
10. Carroll MJ. Collection and Preservation of Fecal Specimens: Collection of Fresh Specimens. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.2.2.1-7.2.2.6, v.2, 1992.
11. Carroll MJ. Examination for pinworm: cellulose tape preparation In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.2.3.1-7.2.3.2, v.2, 1992.
12. Cook J. Duodenal contents: duodenal aspirate. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.6.4.1-7.6.4.5, v.2, 1992.
13. Crede P. Microscopic examination of fecal specimens: direct smears. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.3.3.1-7.3.3.3, v.2, 1992.
14. Crede P. Microscopic examination of fecal specimens: concentration by formalin-ethyl acetate sedimentation. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.3.4.1-7.3.4.5, v.2, 1992.
15. De Carli GA. Diagnóstico Laboratorial das Parasitoses Humanas. Métodos e Técnicas. Rio de Janeiro: MEDSI, 1994.
16. Garcia LS. Calibration of microscope with an ocular micrometer. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.3.2.1-7.3.2.4, v.2, 1992.
17. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3rd ed. Washington: ASM Press, 1997.
18. González-Ruiz A, Bendall RP. Size Matters: The use of the ocular micrometer in diagnostic parasitology. Parasitol Today 11:83-85, 1995.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

19. Kaplan RL. Microscopic examination of fecal specimens: permanent stained smear (Trichrome) In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.3.6.1-7.3.6.6, v.2, 1992.

20. Melvin DM, Brooke MM. Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites. 3rd ed. HHS publication N.º (CDC) 82-8282. Atlanta: Laboratory Training and Consultation Division, Centers for Disease Control, 1982.

21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical Laboratory Procedure Manuals. 2nd ed. Approved guideline GP2-2A. Villanova: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1992.

22. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Use of Blood Film Examination for Parasites. Tentative guideline. M15-T. Vayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1992.

23 Neimeister R. Introduction. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.1-7.1.11, v.2, 1992.

24. Shawar R. Culture of larval-stage nematotedes: Baermann technique: In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.5.1.1-7.1.1.4, v.2, 1992.

25. Shawar R. Culture of larval-stage nematodes: Harada-Mori technique. In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.5.2.1-7.5.2.3, v.2, 1992.

26. Shawar R. Culture of larval-stage nematodes: Petri dish-filter paper slant In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.5.3.1-7.5.3.3, v.2, 1992.

27. Shimizu RY. Special stains for coccidia and cyanobacterium-like bodies: modified Kinyoun's acid-fast stain (cold). In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.4.1.1-7.1.1.3, v.2, 1992.

28. Shimizu RY. Special stains for coccidia and cyanobacterium-like bodies: modified Ziehl-Neelsen acid-fast stain (hot). In: Insenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 7.4.2.1-7.1.2.4, v.2, 1992.

29. Stewart CE, Koepke JA. Basic Quality Assurance Practices for Clinical Laboratories. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989.

SUGESTÕES PARA LEITURA

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical Laboratory Procedure Manuals. 2nd ed. Approved guideline GP2-2A. Villanova: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1992.

2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Use of Blood Film Examination for Parasites. Tentative guideline. M15-T. Vayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1992.

3. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedures for the Recovery and Identification of Parasites from the Intestinal. Proposed guideline M28-A. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CAPÍTULO 33



Manutenção e Controle de Qualidade de Equipamentos

Tiana Tasca
Silvana de Almeida

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O laboratório de Parasitologia utiliza diferentes equipamentos nos métodos e nas técnicas de diagnósticos, conseqüentemente o controle de qualidade (CQ) desses aparelhos é necessário para assegurar a confiabilidade dos resultados, os quais dependem da eficiência e do uso apropriado do equipamento. Na hora da compra de um equipamento a escolha deve ser baseada nos critérios de padronização do uso, volume, custo, facilidade de operação, tempo de vida útil e eficiência. A principal fonte destes dados é o fabricante, que deve seguir determinadas leis e regulamentações para fornecer informações fidedignas[15]. No entanto, a responsabilidade de uma operação de sucesso de um equipamento não é restrita ao fabricante. O laboratório deve fornecer localização adequada, espaço, utilitários (energia elétrica, água, gases), ambiente compatível e pessoal treinado. Dependendo da complexidade do equipamento, a instalação deve ser feita por pessoal especializado[15]. Cuidados simples, como a leitura do manual do aparelho, podem fornecer informações muito importantes, evitando futuros problemas e garantindo o funcionamento adequado do mesmo. A manutenção preventiva, a limpeza, a calibração e o controle de qualidade são fundamentais para o correto funcionamento dos equipamentos. Este capítulo apresenta normas de manutenção e controle de qualidade para serem aplicados em alguns equipamentos utilizados no laboratório de Parasitologia,

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

entre os quais estão incluídos: autoclave, balança, banho de água, capela de segurança biológica, centrífuga, geladeira, *freezer*, estufa microbiológica, estufa de esterilização, microscópio e termômetros.

Autoclave

Manutenção Preventiva: A autoclave deve ser instalada em área com boa ventilação. Os materiais colocados em seu interior devem permitir a livre circulação do vapor. Enquanto estiver sendo efetuado o aquecimento à pressão, não mexer no orifício de drenagem, na válvula de saída de ar ou na válvula de segurança. Antes de abrir a autoclave deve-se esperar que a pressão retorne a 0kgf/cm^2 e que a temperatura seja inferior a 60ºC. Os líquidos a serem autoclavados não devem exceder 2/3 do volume do frasco, pois durante a fervura pode ocorrer extravasamento[12].

Controle de Qualidade: Utilizar controles químicos, como papel indicador de esterilização e um indicador biológico, a cada uso da autoclave. O papel indicador é uma fita adquirida comercialmente que apresenta mudança de coloração ao ser exposta à temperatura de esterilização. O indicador biológico consiste em um cordão impregnado com 10^4 a 10^6 esporos do *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 7.953)/ml de cultivo. Esses esporos são resistentes à temperatura de 121ºC, por 15 minutos à pressão de uma atmosfera. Após serem submetidos ao processo de esterilização, os cordões devem ser incubados em meio de cultura apropriado à temperatura de 35-37°C, em estufa microbiológica. Caso a temperatura de esterilização não tenha sido atingida ou o tempo não tenha sido suficiente, após a incubação por 24-48 horas, nas condições descritas, ocorre desenvolvimento de formas vegetativas e conseqüente turvação do meio de cultura[1]. A válvula de segurança deve ser inspecionada semanalmente para evitar que abra durante o trabalho. Para se prevenir de acidentes com vapor, manter as mãos, face e qualquer parte do corpo afastados da saída da válvula quando estiver trabalhando com pressão elevada. As limpezas externa e interna devem ser feitas sempre que necessário e no mínimo uma vez por semana. A borracha de vedação da tampa deve ser trocada quando estiver desgastada. O tempo requerido para se atingir a temperatura e a pressão desejadas deve ser anotado com o objetivo de analisar possíveis desgastes do aparelho[12].

Banho de Água

Manutenção Preventiva: O banho de água deve ser colocado em um plano nivelado afastado de fontes de calor ou de frio (motores, condicionadores de ar, janelas), pois rapidamente ocorrem trocas térmicas com o ambiente. O banho deve ser mantido fechado para evitar diminuição da temperatura e evaporação da água. A adição de óleo mineral sobre a água do banho evita os problemas anteriormente mencionados; no entanto, dificulta a limpeza dos tubos mergulhados e os ajustes rápidos de temperatura. Não devem ser utilizados suportes ou outros materiais metálicos ou sujos que podem

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

favorecer a oxidação ou incrustação na parte interna do banho. Um termômetro calibrado deve ser mantido em local próprio no banho. A água derramada próxima a conexões ou fios elétricos deve ser imediatamente retirada e dispositivos elétricos próximos a este equipamento devem ser evitados. A limpeza e a troca de água devem ser feitas semanalmente ou sempre que houver necessidade. A água do banho, do aquecedor e da bomba deve ser completamente retirada e após a limpeza deve ser substituída por água destilada-deionizada ou água destilada-desmineralizada. Para a limpeza utilizar uma esponja macia com detergente e água quente. Em banhos de aço inoxidável não se deve utilizar detergentes abrasivos ou clorados. Com a finalidade de impedir a contaminação bacteriana, adiciona-se solução de tiomersal 1:1.000[3,15]. Caso ocorra derramamento de algum material biológico contaminado no interior do banho de água, deve-se aguardar 30 minutos para que os aerossóis assentem. Proceder à limpeza do banho com luvas e máscara, adicionando-se desinfetante fenólico ou doméstico em uma concentração de 10%. O nível correto de água é determinado de acordo com o nível de líquido de dentro dos tubos; o nível de água no banho deve ser igual ou superior ao nível de dentro do tubo sem invadir seu interior. Os frascos com amostras devem ser cobertos com a tampa ou com filme plástico ao serem colocados no banho de água[3].

Controle de Qualidade: Diariamente, verificar visualmente se há crescimento de bactérias, fungos ou algas ou se há depósitos de minerais nas paredes do banho. Em caso afirmativo, proceder à limpeza e remoção dos contaminantes. O nível de água também deve ser verificado diariamente; se estiver freqüentemente abaixo do determinado, deve-se procurar a causa da perda de água, que pode se dar por vazamentos ou evaporação excessiva. A temperatura deve ser medida com termômetro calibrado duas ou três vezes por dia e anotada em uma planilha adequada, para que seja possível uma análise das possíveis causas de variação de temperatura. Semestralmente, limpar as incrustações e oxidações com ácido tartárico[3].

Balança

Manutenção Preventiva: Verificar se a balança está nivelada apropriadamente. Deve estar localizada em uma mesa livre de vibrações, afastada de correntes de ar e ventiladores. Verificar a limpeza da balança, principalmente do prato. Evitar oscilações durante a pesagem, manuseando o prato cuidadosamente. Colocar o material no centro do prato. Aferir os pesos sistematicamente, em ordem decrescente, iniciando com um peso maior que o requerido. Não exceder o peso máximo permitido pela balança. Não pesar materiais quentes antes que voltem à temperatura ambiente. Os frios podem também condensar umidade, a qual pode incrementar o peso[7]. Manter a balança limpa após usá-la e protegê-la com uma capa. Controlar os pesos e as balanças com os pesos do *National Bureau of Standards* (NBS) para a exatidão[7].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Manutenção Preventiva e Cuidados Importantes: Não obstruir o fluxo de ar cobrindo as passagens com equipamento ou materiais e evitar colocá-los a menos de 4cm da abertura frontal. Realizar o mínimo de movimentos possível e mover os braços lentamente para fora e para dentro da capela. Equipamentos usados no interior da capela não devem produzir correntes de ar que interfiram no fluxo de ar, como, por exemplo, microcentrífugas que geram forte turbulência de ar[11]. Amarrar tiras ou fitas de material leve, como tecido, para a visualização e monitorização da direção do fluxo de ar. Usar equipamento de proteção individual, como jaleco e luvas. Em caso de material altamente infectante, usar roupas adequadas (macacão de material impermeável, máscara com membrana de carvão ativado, touca, propés, dois pares de luvas esterilizadas) e isolar a capela[10]. Para prolongar a vida útil do filtro HEPA (*High-Efficiency Particulate Air*) e reduzir o barulho, desligar a capela quando esta não estiver em uso. A capela deve ser ligada pelo menos 15 minutos antes do início do trabalho e desligada 15 minutos após o término. Lâmpadas ultravioletas nunca devem ser ligadas quando a capela está em uso. A ventilação e a recirculação do fluxo de ar das capelas deve ser bem planejada. A saída de ar deve ser acima do teto e afastada de aberturas do prédio. Os sistemas de ductos para capelas de exaustão funcionam bem, mas não são imprescindíveis. As capelas que permitem a saída de ar no interior do laboratório não devem ser usadas para materiais voláteis, como éter, acetona ou grandes volumes de álcool. Uma capela de segurança biológica deve ser instalada, preferencialmente, em uma sala separada e a porta deve ser mantida fechada durante a operação. Deixar um espaço livre de 7cm entre o fundo da capela e a parede e de 4cm dos lados da capela. A saída do fluxo de ar através do filtro HEPA, no teto da capela, não pode ser obstruída; deve haver um espaço livre de 20cm. A capela deve ser afastada de áreas de tráfego intenso e correntes de ar produzidas pela abertura de portas de refrigeradores e incubadores, pelos condicionadores de ar e ventiladores, bem como as janelas devem ser mantidas fechadas durante o trabalho na capela[11]. Fontes de calor, como bicos de Bunsen, interferem no fluxo do ar e o calor excessivo pode causar danos no filtro HEPA. Portanto, deve-se usar a chama na intensidade mínima e sempre com o fluxo de ar em funcionamento. A localização de válvulas de gás e de vácuo no interior da capela deve ser de fácil alcance para o usuário, geralmente na parede lateral[11].

Controle de Qualidade: Diariamente deve ser realizada a desinfecção de rotina: com a capela ligada, mas antes de iniciar o trabalho, limpar as superfícies incluindo as paredes, com desinfetante. Podem ser usados como desinfetantes: compostos fenólicos, hipoclorito a 0,5% e etanol 70%. Verificar se o fluxo de ar está funcionando na direção da área de trabalho da capela. Registrar a leitura do aferidor, quando houver. Cobrir a superfície de trabalho com material absorvente para minimizar a poeira e facilitar a assepsia. Semanalmente, limpar as lâmpadas ultravioleta com álcool a 70%. Mensalmente, remover as telas da ventilação e limpar as canaletas com

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

desinfetante. Medir a produção de luz ultravioleta. A capela deve ser vistoriada semestralmente por pessoal especializado[11].

Centrífuga

Manutenção Preventiva e Cuidados Especiais: A precaução mais importante é balancear a carga. Vibração excessiva, sempre devida a uma carga não balanceada pelo operador, pode quebrar tubos ou ressuspender o sedimento durante a desaceleração. Os rolamentos que sustentam o eixo devem ser lubrificados e vedados, em intervalos de três a seis meses, ou após um número específico de horas de operação, recomendados pelo fabricante. A câmara da centrífuga deve ser limpa no mínimo a cada quatro dias, geralmente com detergente ou sabão e água quente. Limpar todos os adaptadores imediatamente com desinfetante ou solução microbicida apropriada, quando material infectante for centrifugado. Preferencialmente, não usar tetracloreto de carbono ou clorofórmio ou outros compostos químicos tóxicos (tais como hidrocarbonetos aromáticos, benzeno, tolueno, xileno ou gasolina). Além destes, fenol, acetona e bases fortes, como hidróxido de sódio e de amônio, devem ser evitados[8]. Quando o material a ser centrifugado for infectante deve-se usar tubos plásticos inquebráveis com tampas que impeçam formação de aerossóis. Quando um tubo contendo material infectado quebrar dentro da centrífuga, procede-se da seguinte maneira:

a. Suspender a respiração.

b. Fechar a tampa da centrífuga.

c. Avisar a todos para suspenderem a respiração, saírem da sala e fecharem a porta.

d. Deixar que os aerossóis assentem pelo menos por 30 minutos.

e. Uma pessoa pode, então, entrar na sala e limpar a centrífuga com solução desinfetante designada (apropriadamente vestida, com luvas e máscara)[2].

Nunca centrifugar grandes volumes de líquidos inflamáveis, que podem volatilizar e penetrar no motor, onde uma faísca pode provocar a ignição. Aguardar até a centrífuga parar completamente antes de remover o material. Caso o material possa ficar comprometido com a temperatura da sala, deve-se usar uma centrífuga refrigerada. Dentro do possível, a centrífuga deve estar posicionada em um lugar de fácil acesso aos usuários, mas onde o barulho gerado não cause transtornos. O local deve oferecer nível estável, principalmente no caso de centrífugas de mesa. A conecção à energia elétrica deve ser individual e segura. A calibração inicial deve ser realizada pelo fabricante e a calibração da velocidade de rotação da centrífuga deve ser feita somente por pessoal especializado[2].

Controle de Qualidade: A cada utilização, mesmo se usada mais de uma vez por dia, deve-se balancear a carga. Verificar se a temperatura apropriada é mantida durante a operação. Limpar qualquer derrame imedia-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

tamente. Diariamente deve-se abrir a tampa quando a centrífuga for refrigerada e desligada à noite, para secar o interior. Durante o dia, quando o equipamento está sob refrigeração, manter a tampa fechada para evitar condensação. Limpar o interior da centrífuga com solução desinfetante não corrosiva. Semanalmente, verificar se todos os respiradouros estão limpos e abertos. Limpar o rotor, os cartuchos e o interior com desinfetante. Se materiais contendo brometo de etídio foram centrifugados, verificar o interior da centrífuga com lâmpada ultravioleta, a fim de detectar resíduos fluorescentes. Se forem encontrados, limpar até a fluorescência desaparecer. Mensalmente, usar o condensador a vácuo para limpar bobina, ventilador, tela e filtros das centrífugas refrigeradas e verificar as escovas se a centrífuga é muito usada. Inspecionar as conecções elétricas. Verificar a calibração da velocidade com taquímetro fotoelétrico, mensal ou semestralmente. Verificar, semestralmente, a temperatura usada rotineiramente no interior da centrífuga refrigerada com um termômetro calibrado e verificar as escovas se a centrífuga é moderadamente ou pouco usada. Anualmente, a velocidade deve ser calibrada por um profissional especializado[2,8].

Geladeira

Manutenção Preventiva e Cuidados Técnicos: A geladeira deve ser instalada em local nivelado e que permita ventilação adequada. O ideal é um circuito elétrico para cada geladeira, extensões não devem ser usadas. O chão em torno da geladeira deve ser mantido seco para evitar problemas com eletricidade. O termorregulador deve ser ajustado para garantir a temperatura de aproximadamente 4°C. Recomenda-se abrir a geladeira poucas vezes e por períodos curtos, verificando se a porta ficou bem fechada. A instalação de um sistema de alarme, que dispara quando as variações de temperatura ultrapassam o limite de tolerância, aumenta a segurança, devendo ser conectado a um circuito separado, que permaneça funcionando quando acontecer algum problema com a geladeira. A distribuição conveniente dos reagentes, os mais usados na frente e os menos usados no fundo, facilita o seu manuseio e diminui o tempo de abertura da porta da geladeira. Os reativos em estoque devem ser guardados em uma geladeira separada dos reativos de uso diário. Alimentos não devem ser guardados na mesma geladeira de reativos e amostras. Materiais voláteis ou explosivos necessitam ser armazenados em pequenas quantidades e em recipientes de metal. Materiais radioativos devem ser armazenados em geladeiras próprias com identificação na porta[4]. Todo material armazenado na geladeira deve ser identificado com nome do reagente, datas de fabricação e de vencimento, nomes dos responsáveis pela confecção e pelo uso. Este procedimento facilita a limpeza e a organização da geladeira. A descongelação e a limpeza devem ser feitas periodicamente (três meses) ou sempre que necessário. Os materiais devem ser transferidos para outra geladeira ou mantidos em gelo. Os compartimentos onde são armazenados materiais biológicos contaminados necessitam ser limpos com desinfetantes fenólicos ou clorados, deixando o desinfetante no local por cerca de 30 minutos. As conexões elétricas devem ser verificadas diariamente no início e no final do expediente[4].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Controle de Qualidade: A temperatura deve ser controlada diariamente, após a primeira abertura da manhã e ao final do expediente, nos vários níveis da geladeira. Os valores de tolerância sugeridos são de 4-8ºC. Os termômetros devem estar mergulhados em um recipiente com líquido, permitindo a estabilização da temperatura para a leitura. Para a obtenção de mais dados utilizar termômetros de máximas e mínimas, que registram a temperatura máxima e a mínima ocorrida no compartimento. Estes dados devem ser colocados em um gráfico para melhor análise das variações de temperatura ocorridas e de suas prováveis causas. Deve-se controlar a circulação de ar interno diariamente, abrindo-se a porta da geladeira e visualizando-se o ventilador em funcionamento ou ouvindo seu barulho. A borracha de vedação da porta deve ser verificada semanalmente ou quando necessário. Na presença de bolores (fungos), deve-se limpar o local com solução alvejante a 10%, enxaguar, secar e aplicar uma fina camada de vaselina, que ajuda a manter a flexibilidade. Quando a borracha da porta apresentar rachaduras, deformações ou cortes, é necessário providenciar sua troca[4,13].

Freezer

Manutenção Preventiva: Os cuidados já mencionados para a geladeira devem ser seguidos também para o *freezer.* Uma das precauções adicionais para *freezers* é evitar o uso de equipamentos com dispositivo de descongelação automática, pois as flutuações de temperatura podem ocasionar decomposição de materiais estocados. Os *freezers* devem ser descongelados três a quatro vezes por ano ou quando a camada de gelo ultrapassar 1cm[4].

Controle de Qualidade: Para o *freezer*, devem ser controladas a temperatura e a vedação da porta, como já citado para a geladeira. A variação de temperatura aceitável para *freezers* a -20 e -40ºC é de ± 5ºC e para -60ºC ou menos a variação pode alcançar ± 10ºC. O termômetro deve ser colocado em um frasco contendo uma solução que não congele à temperatura do *freezer*, como, por exemplo, solução de glicerina 50% em água ou solução de polietilenoglicol[8]. É recomendável a utilização de um dispositivo adicional para indicar a falta de refrigeração. Este dispositivo pode ser feito com uma solução colorida (solução de sulfato de cobre), que, após ser congelada em pequenos frascos, é distribuída em vários pontos do freezer com a tampa virada para baixo. Quando a temperatura no interior do freezer aumenta, ocorre a fusão do material no interior dos frascos e a solução colorida desloca-se para a parte mais baixa do frasco. Diariamente também é necessário verificar se o gelo acumulado não está interferindo no fechamento da porta[4].

Estufas Microbiológicas

Manutenção Preventiva: Os termômetros internos devem ser colocados afastados das portas das estufas microbiológicas. As estufas devem

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

ser abertas somente quando necessário. Como referência, a temperatura não deve diminuir mais de 5ºC[6]. Nas estufas de CO_2 os tanques de gás devem ser afastados do fluxo das pessoas que trabalham no laboratório e, preferencialmente, isolados por paredes. Quando não há espaço adequado para todas estas precauções, os tanques devem ser colocados em uma sala separada e uma tubulação que atravessa a parede ou o teto conecta o CO_2 à estufa. As estufas microbiológicas devem ser localizadas em uma superfície nivelada e livre de vibrações, deve haver espaço para a porta da estufa abrir completamente e para circulação do ar em torno da mesma. As estufas de CO_2 requerem espaço também para dois tanques de CO_2 para emergências, fins-de-semana e férias. A conecção à rede elétrica deve ser segura e, se possível, a um sistema de emergência hospitalar. Não usar extensões elétricas. A estufa deve ser afastada de condicionadores de ar e ventiladores. Para operação mais eficiente, a temperatura ambiente deve ser no mínimo 5ºC mais baixa do que a desejada na estufa[6].

Controle de Qualidade: Ler e registrar, diariamente, a temperatura. Verificar o nível de CO_2. Limpar, semanalmente, os compartimentos interno e externo da estufa. Quando necessário e, no mínimo, uma vez ao ano, inspecionar os cabos e a conexão elétrica. Verificar o nível das prateleiras e a borracha de vedação da porta da estufa[6].

Estufa de Esterilização

Manutenção Preventiva: A estufa (ou forno) de esterilização deve ser instalada em local adequado, afastada de autoclaves ou de outras fontes de calor. A exposição direta ao sol deve ser evitada. A estufa de esterilização necessita de um circuito elétrico separado dos demais equipamentos. Para facilitar a circulação de ar no interior da estufa deve-se deixar pelo menos 5cm de espaço em todos os lados. Materiais explosivos, combustíveis ou inflamáveis nunca devem ser colocados na estufa, bem como óleos, que volatilizam e depositam-se na vidraria posteriormente adicionada[9]. Pode ser realizada calibração do dispositivo de controle de temperatura da estufa com um termômetro certificado e controlado. Manter a porta fechada durante o uso e esperar baixar a temperatura antes de abri-la. Não colocar recipientes com líquido em seu interior e verificar se a vidraria não contém água excedente[13]. O material a ser esterilizado deve ser colocado na estufa quando esta apresentar temperatura abaixo de 40ºC. Uma vez alcançada a temperatura desejada (segundo o propósito secagem-esterilização) controlar o tempo[9].

Controle de Qualidade: Controlar e anotar a temperatura no interior da estufa com um termômetro certificado. O controle da esterilização pode ser feito com os mesmos indicadores químicos e biológicos descritos para a autoclave. A limpeza deve ser feita a cada seis meses e a sujeira incrustada deve ser retirada com sabão e água[9].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Microscópio Óptico

Manutenção Preventiva: O microscópio deve ser localizado em superfícies livres de vibração de centrífugas ou de outros equipamentos e afastado de janelas, as quais devem ser ajustadas para permitirem a entrada de luz solar apropriada. Não deve ser removido constantemente e deve haver espaço ao seu redor para os registros. O uso de uma cadeira ajustável permite a regulagem de altura adequada para diferentes pessoas, visando ao conforto durante o trabalho[5]. Ao desligar o microscópio, posicionar a lente objetiva de menor aumento antes de remover a lâmina. Remover o óleo de imersão das lentes objetivas após cada uso. Usar somente papel macio para limpar as objetivas. Usar soluções de limpeza recomendadas pelo fabricante. Éter etílico (extremamente inflamável) e xileno (tóxico) não prejudicam as objetivas. Não usar álcoois (metílico, etílico, isopropílico) e acetona, pois podem apagar as informações impressas nas objetivas[5]. Proteger o microscópio com uma capa quando não estiver sendo usado. Não tocar nas lâmpadas; usar papel macio para inseri-las no compartimento de fonte de luz. Nos exames de lâminas a fresco, reduzir a luz e aumentar o contraste. Sempre transportar o microscópio com uma das mãos segurando a base e a outra, o braço. Nunca remover o microscópio pelas objetivas. Manter o óleo de imersão bem fechado e livre de poeira e dejetos. Não trocar objetivas entre microscópios, a menos que as especificações de comprimento do tubo mecânico sejam equivalentes ou que o microscópio tenha sido calibrado com tais objetivas[5].

Controle de Qualidade: Limpar, diariamente, o óleo de imersão das objetivas e do condensador. Desligar a fonte luminosa do microscópio. Colocar a capa do microscópio. Usar, mensalmente, uma escova macia para retirar a poeira. Limpar objetivas, oculares e condensador com solução desinfetante e papel macio. Limpar o corpo do microscópio e a base da fonte luminosa (incluindo filtro azul, se usado) com um pano úmido. O microscópio deve ser limpo, lubrificado e inspecionado, semestralmente, por pessoal especializado[5] (Fig. 33.1).

Termômetros

Os termômetros de vidro contendo líquido são fabricados fixando-se um ou dois pontos, tais como os pontos de fusão e ebulição da água, e então se divide o espaço nas partes apropriadas. As temperaturas medidas no laboratório raramente são estes pontos fixos; portanto, os termômetros do laboratório devem ser calibrados através de um termômetro referência do *National Bureau of Standards* (NBS)[14]. O método mais usado é a calibração com um menisco crescente, isto significa que a calibração deve iniciar com uma temperatura mais baixa. Por exemplo, para calibrar 37ºC a leitura do termômetro deve ser mais baixa do que 37ºC e então a coluna de mercúrio eleva-se lentamente até a temperatura desejada. Uma coluna de líquido descendente não deve ser usada para calibração. Caso não necessitem de correção, os termômetros podem ser numerados e os resultados registrados[14].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

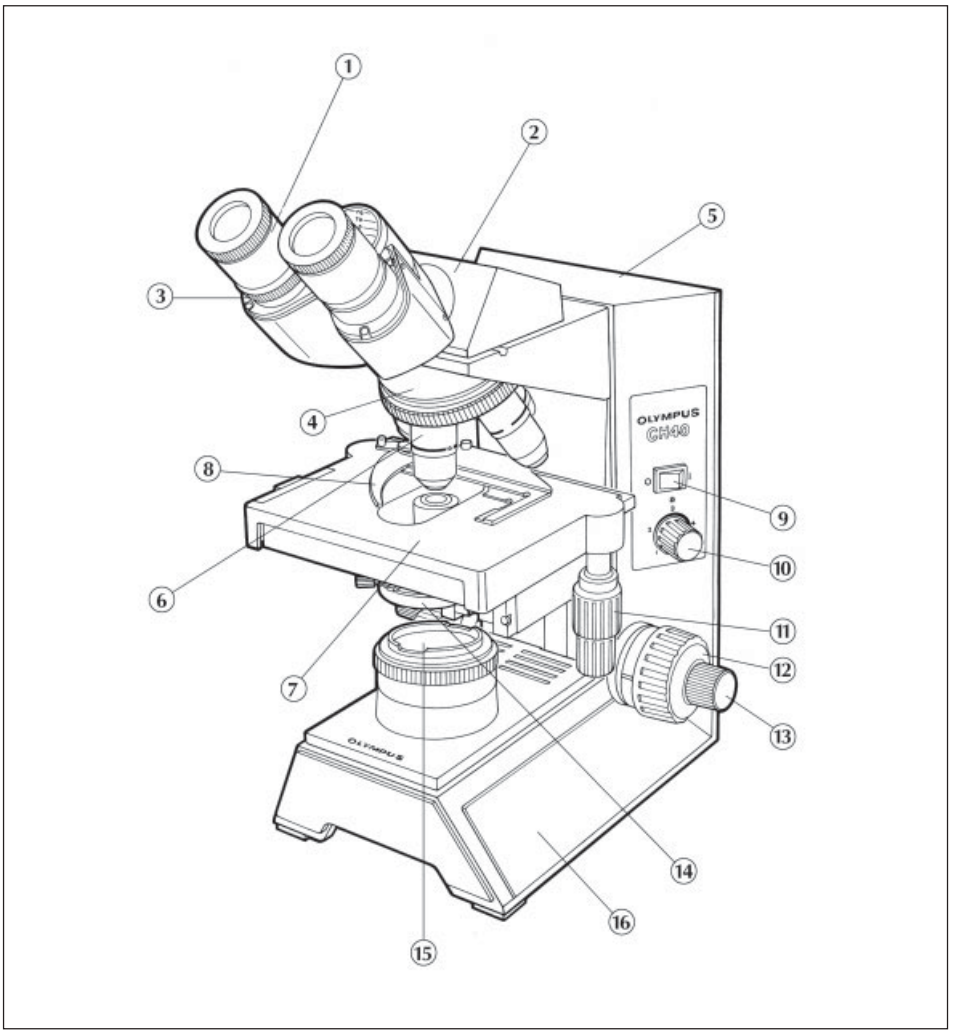


Fig. 33.1 — *Microscópio óptico. 1. oculares; 2. tubo mecânico ou canhão; 3. anel das dioptrias; 4. revólver; 5. braço; 6. objetivas; 7. platina; 8. charriot; 9. interruptor da luz; 10. botão de intensidade da luz; 11. parafuso do charriot; 12. macrométrico; 13. micrométrico; 14. condensador; 15. diafragma do campo luminoso; 16. base*. (Cortesia de Olympus Optical Co. Ltda Tokyo, Japan).

Manutenção Preventiva: Usar os termômetros na posição vertical, porque os mesmos são calibrados nesta posição. Após medir altas temperaturas, resfriar o termômetro se o mesmo for usado imediatamente para medir uma temperatura baixa. Após cada uso, permitir que o termômetro retorne à temperatura ambiente na posição vertical antes de ser guardado. Recalibrar os termômetros freqüentemente, ou no mínimo duas vezes ao ano, através de um termômetro de referência. Quando se calibrar mais de um ponto, fazer primeiro o da temperatura mais baixa. Quando o termômetro for usado em banhos de água, submergir o bulbo completamente no banho antes de realizar as leituras. Não utilizar termômetros com colunas de líquido rompidas, nem com líquido acumulado no fundo do bulbo. Não deixar termômetros em líquidos que tendem a solidificar ou em equipamentos nos quais a temperatura ultrapassa o limite do termômetro. Guardar os termômetros na posição

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

vertical. Ler os termômetros somente após a coluna de líquido ter se estabilizado. Não expor os termômetros a altas ou baixas temperaturas desnecessariamente[14].

Controle de Qualidade: Quando são feitas as leituras das temperaturas diariamente ou a cada uso, inspecionar visualmente o termômetro com o objetivo de verificar se a coluna de mercúrio não está separada[15]. A cada três meses, verificar todos os termômetros com subdivisões menores ou iguais a 0,1ºC. Verificar, semestralmente, todos os termômetros com subdivisões menores ou iguais a 1ºC[14].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Antunes GS. Manual de Diagnóstico Bacteriológico. 2a ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1991.
2. Baron EJ, Ricker T. Centrifugue. In: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, p. 12.6.1-12.6.13. v.2, 1992.
3. Borgeson B. Water Bath. In: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, p.12.21.1-12.21.5. v.2, 1992.
4. Butsumyo A, Velasco SA. Refrigerators and freezers. In: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, p. 12.18.1-12.18.11. v.2, 1992.
5. Clancy MN, Cohen M, Garcia LS. Bright-Field Microscope. In: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington, DC: ASM Press, p. 12.14.1-12.14.19. v.2, 1992.
6. Cook JH. Incubator. In: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, p. 12.12.1-12.12.13. v.2, 1992.
7. Dharan M. Control de Calidad em los Laboratorios Clínicos. Barcelona: Editorial Reverté AS, 1980.
8. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3nd ed. Washington (DC): ASM Press, 1997.
9. Hahn B. Oven (Hot Air). In: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, p. 12.15.1-12.15.5. v.2, 1992.
10. Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Manual de Quimioterapia & Nutrição Parenteral. Porto Alegre, 1994.
11. Mann LM. Biological Safety Cabinet. In: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, p. 12.19.1-12.19.16. v.2, 1992.
12. Nelson EA, Molitoris E. Autoclave (Steam Sterilizer). In: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, p. 12.3.1-12.3.7. v.2, 1992.
13. Pozzoli, Jimenez LV, Gómez V et al. Manual de Control de Calidad en Quimica Clinica. Asunción: Cooperación Técnica Alemana, 1991.
14. Tyburski MB. Thermometers. In: Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): ASM Press, p. 12.20.1-12.20.9. v.2, 1992.
15. Wilkox KR Jr., Baynes TE Jr., Crable JV et al. Laboratory Management. In: Inhorn SL, ed. Quality Assurance Practices for Health Laboratories. Washington: American Public Health Association, 3-125, 1978.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CAPÍTULO 34



Biossegurança em Laboratórios de Parasitologia

Marco Mastroeni

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Várias atividades desempenhadas pelo homem estão envolvidas com certos riscos relacionados à natureza do trabalho. Estes riscos tornam-se evidenciáveis quando não são realizadas medidas corretas de segurança, tanto para o trabalhador como para a comunidade em geral.

Ocasionalmente, um grande número de pessoas que trabalha em laboratórios tem se infectado pela manipulação de microrganismos, que geram infecções, resultando em morte. Não existe uma maneira de se determinar com acurácia o número de pessoas envolvidas, dada a ocasionalidade destes acidentes. Um estudo do problema, contudo, revelou que a incidência de contaminação aumentou com a descoberta de novos agentes e que cada vez mais pessoas têm se contaminado com a manipulação de agentes infecciosos. Nos últimos anos, o conhecimento científico e as práticas de controle de riscos biológicos evoluíram muito rapidamente. Com isto, pesquisas estão sendo desenvolvidas de maneira a se determinar a extensão do problema, localizando as fontes de contaminação e elaborando normas que possam garantir um mínimo de segurança e proteção ao trabalhador em geral. Com o desenvolvimento da Biotecnologia, a partir dos anos 70, nosso cotidiano passou a ser cada vez mais alterado. Como um bom exemplo, podemos citar as técnicas de modificação genética, onde é possível gerar variados processos

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

e produtos que podem modificar e interferir na qualidade de vida do homem, dos animais e do meio ambiente. A utilização destas técnicas vem gerando benefícios econômicos e sociais para a humanidade, como, por exemplo, a prevenção e o diagnóstico de doenças, a produção de fármacos, o controle biológico de pragas e vetores e o aumento de produtividade agropecuária, entre outros.

Ao mesmo tempo em que as técnicas vão sendo aperfeiçoadas e que se constroem as possibilidades de novos produtos, vão se constituindo ambientes regulatórios, que, aparentemente, colocam um freio nos investimentos em projetos de pesquisa envolvendo organismos patogênicos. A razão da existência dessas regulamentações reside nos riscos potenciais a que estão sujeitas tais experiências e a necessidade de se impor regras de controle com o intuito de gerar maior segurança e melhor qualidade no desenvolvimento das pesquisas. Estas regras de controle desempenham fundamental papel na prevenção de acidentes que freqüentemente ocorrem em laboratórios de pesquisa, constituindo, assim, as normas de biossegurança. Algumas destas normas, junto aos demais aspectos que se relacionam à área de biossegurança em geral, serão abordadas de forma sintetizada neste capítulo, proporcionando uma visão geral da aplicabilidade de técnicas e procedimentos de laboratório, que somam melhor qualidade e segurança ao produto, processo e trabalho.

BIOSSEGURANÇA: CONCEITO E IMPORTÂNCIA

Segurança biológica ou biossegurança é a aplicação do conhecimento, das técnicas e equipamentos à prevenção pessoal, laboratorial e à exposição ao meio ambiente, de agentes potencialmente infecciosos ou biorriscos. Biossegurança define as medidas de contenção sobre as quais os agentes infecciosos podem ser manipulados de forma segura. O objetivo da contenção é reduzir o potencial de exposição aos profissionais do laboratório, pessoas externas ao laboratório, e ao meio ambiente, de agentes potencialmente infecciosos[8]. Despertar a importância das medidas de segurança no dia-a-dia do pesquisador e a possibilidade de se evitar acidentes, quando medidas corretas de segurança são tomadas, é a principal meta das regulamentações em biossegurança. Em laboratórios de Parasitologia, a equipe de pesquisadores trabalha com microrganismos infecciosos ou com materiais que contêm ou que podem conter tais microrganismos. Alguns desses microrganismos são patogênicos ou podem vir a sê-lo, de acordo com as circunstâncias e a dose. Portanto, a prevenção da infecção é um elemento essencial da competência profissional desses pesquisadores. É preciso proteger não apenas os pesquisadores, seus ajudantes e contatos, mas, também, o material utilizado deve ser protegido contra a possível contaminação cruzada, visto que esta pode invalidar o trabalho e fornecer falsos resultados[4]. Devemos levar em consideração, também, a existência de vários outros riscos associados ao ambiente de trabalho, como perigos ligados aos compostos químicos, fatores físicos, radioatividade, riscos ergonômicos, incêndio e outros que, se não forem tratados com seriedade, podem alterar drasticamente a função de um trabalhador.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

NÍVEIS DE BIOSSEGURANÇA

De maneira a organizar os diferentes tipos de laboratórios, segundo o risco que apresentam ao pesquisador e ao meio ambiente, quatro níveis de biossegurança foram classificados: níveis de biossegurança 1, 2, 3 e 4. Estes níveis de contenção física consistem de combinações de técnicas e práticas de laboratório, equipamentos de segurança e arquitetura laboratorial[3]. A seleção de um nível de segurança apropriado à manipulação de um agente em particular depende de vários fatores. Alguns dos mais importantes compreendem: virulência, patogenicidade, estabilidade biológica, vias de contaminação; natureza ou função do laboratório; procedimentos e funções envolvendo o agente; endemicidade do agente e disponibilidade de vacinas efetivas ou medidas terapêuticas. Este procedimento diminui os riscos de acidentes, principalmente ao trabalhador, e possibilita calcularmos as devidas precauções a serem tomadas em caso de eventual imprevisto[11].

Nível 1 de Biossegurança

Aplicado a pesquisas que utilizam linhagens viáveis de microrganismos caracterizados e bem definidos e que conhecidamente não causam doença em humanos adultos saudáveis. Nenhuma característica de desenho é requerida, além de um bom planejamento espacial e funcional. Não é necessária a aplicação de barreiras de contenção primária e secundária. Utilizado em laboratórios de ensino básico.

Nível 2 de Biossegurança

O nível 2 de biossegurança é aplicado à manipulação de um grande espectro de agentes considerados de risco moderado, presentes na comunidade e associados a doenças humanas que variam quanto à severidade. Os agentes podem ser manipulados com segurança em bancadas abertas, desde que o potencial à produção de aerossóis ou gotejamentos de culturas seja baixo. Precauções primárias com o pessoal que trabalha com estes agentes incluem acidentes com objetos perfurocortantes, exposições cutâneas ou ingestão de material infeccioso. Procedimentos com elevado grau de aerossóis ou gotejamentos devem ser conduzidos em equipamentos de contenção primária, como os gabinetes de segurança biológica. Equipamentos de contenção primária, como protetor facial, jaleco e luvas, devem ser utilizados de forma apropriada. Barreiras secundárias, como lavar as mãos e adescontaminação dos resíduos, devem estar disponíveis.

Nível 3 de Biossegurança

O nível 3 de biossegurança é aplicado à manipulação de agentes potencialmente letais e de alto risco por exposição ou agentes exóticos. Precauções primárias dos trabalhadores a esses agentes incluem auto-inoculação, ingestão e exposição a aerossóis infecciosos. Grande ênfase é direcionada

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

à aplicação das barreiras de contenção primária e secundária de maneira a proteger os trabalhadores, a comunidade e o meio ambiente frente à exposição de aerossóis infecciosos.

Nível 4 de Biossegurança

O nível 4 de biossegurança é o laboratório de mais alto nível de contenção e representa uma unidade geográfica e funcionalmente independente de outras áreas. Este nível de contenção requer barreiras de contenção e equipamentos de segurança biológica especiais, área de suporte laboratorial e um sistema de ventilação próprio, além dos requisitos físicos e operacionais dos níveis 1, 2 e 3.

LABORATÓRIOS CLÍNICOS

Importante comentário deve ser feito com relação aos laboratórios clínicos que recebem, com freqüência, variadas espécies de materiais contaminados para diagnóstico clínico. Tipicamente, a natureza infecciosa do material clínico é desconhecida e os microrganismos são freqüentemente submetidos a uma série de exames microbiológicos para determinação de múltiplos agentes. Desta maneira, torna-se de total responsabilidade do diretor do laboratório o estabelecimento e o cumprimento das normas e procedimentos que garantam um mínimo de segurança necessário à manipulação desses agentes[2]. Exceto em casos extraordinários (suspeita de febre hemorrágica), o processamento inicial e identificação sorológica do material colhido pode ser efetuada em laboratórios de biossegurança nível 2, recomendado quando se trabalha com agentes patogênicos de fluídos corpóreos, como o vírus da hepatite B e o HIV. Barreiras primárias, como as capelas de segurança biológica (Classes I e II), devem ser utilizadas quando forem efetuados trabalhos que provocam gotejamento ou *spray* de material contaminante[2].

EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO

De maneira a modular os trabalhos do pesquisador aos diferentes níveis de biossegurança existentes, faz-se necessária a utilização de equipamentos de proteção que resguarde o trabalhador da exposição aos riscos potenciais. São classificados em dois tipos: equipamentos de proteção individual (EPI) e equipamentos de proteção coletiva (EPC). Estes equipamentos são utilizados como barreira física aos agentes patogênicos, entre outros riscos associados ao ambiente de trabalho. Proporcionam, ainda, segurança básica ao trabalhador, processo e ambiente. Os equipamentos de proteção não devem ser inseridos de forma autoritária na rotina de trabalho; é fundamental que o profissional tenha um prazo para se adaptar a esta rotina, senão, ao invés de proteger, estes equipamentos tornar-se-ão elementos geradores de acidentes[10]. Cabe ainda lembrar, que não há EPI ou EPC que, por si só, seja capaz de garantir a segurança, a não ser que seus usuários apliquem técnicas corretas, baseadas na informação e na compreensão. Estes

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

equipamentos podem até criar uma falsa impressão de segurança e favorecer o descuido, a ponto de aumentar o perigo. Por isso, devem ser planejados, instalados, mantidos e manejados com os devidos conhecimentos. Tão importante e indispensável, ainda, a manutenção e supervisão constantes destes equipamentos são fatores fundamentais a uma correta utilização.

Observações

1. Os equipamentos de proteção individual (EPI) incluem: protetor facial; roupas de laboratório (jaleco); luvas apropriadas aos diferentes tipos de uso; respiradores; calçados; protetor ocular; pipetador automático; pêra de borracha etc.

2. Os equipamentos de proteção coletiva (EPC) incluem: capelas de segurança biológica (CSB); chuveiro de emergência; lava-olhos etc.

CAPELAS DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

As capelas de segurança biológica (CSB) são utilizadas para proporcionar contenção primária ao laboratório quando materiais potencialmente infecciosos estão sendo manipulados[1]. Também podem ser utilizadas para manipulação de culturas estéreis. As CSB devem ser utilizadas em laboratórios de nível 2 ou 3 se houverem procedimentos que gerem aerossóis, alta concentração de agentes infecciosos ou grandes volumes de agentes infecciosos[3]. O pessoal do laboratório deve ser treinado para o correto uso e manutenção das CSB de maneira a garantir proteção efetiva aos trabalhadores e produtos[8]. Existem três tipos de capelas, identificadas em classes, definidas pela área de trabalho (aberta ou fechada), fluxo de ar, equipamentos de filtração e tipos de exaustão. Estas classes incluem:

- Classe I
- Classe II (subdividida em A, B1, B2 e B3)
- Classe III

Capela de Segurança Biológica Classe I

É uma capela ventilada, para proteção individual, onde o ar do ambiente penetra na capela através da frente aberta, sendo extraído por um exaustor e lançado para o exterior por um filtro HEPA. Neste tipo de capela não há proteção para o experimento, somente para o operador e o meio ambiente. É recomendada para trabalho com agente de risco biológico baixo e moderado (Fig. 34.1).

Capela de Segurança Biológica Classe II

Conhecida como capela biológica de fluxo laminar, a capela de segurança biológica Classe II propicia proteção ao operador, ao meio ambiente e ao experimento ou produto. Neste tipo de capela, uma cortina de ar não-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

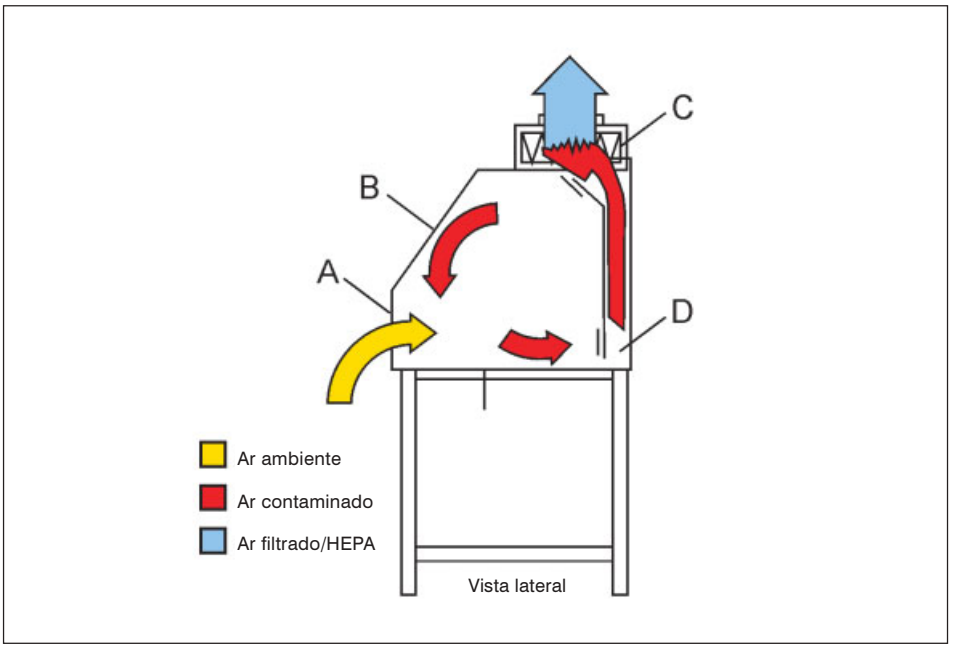


Fig. 34.1 — *Capela de segurança biológica Classe I: A = Abertura frontal; B = Janela; C = Exaustão com filtro HEPA; D = Exaustor. (Fonte: CDC-NIH.)*

filtrado passa da sala à capela, e depois passa por um filtro HEPA situado na parte superior da capela, evitando que os contaminantes transportados pelo ar dentro da capela escapem pela abertura frontal (Fig. 34.2). É o tipo

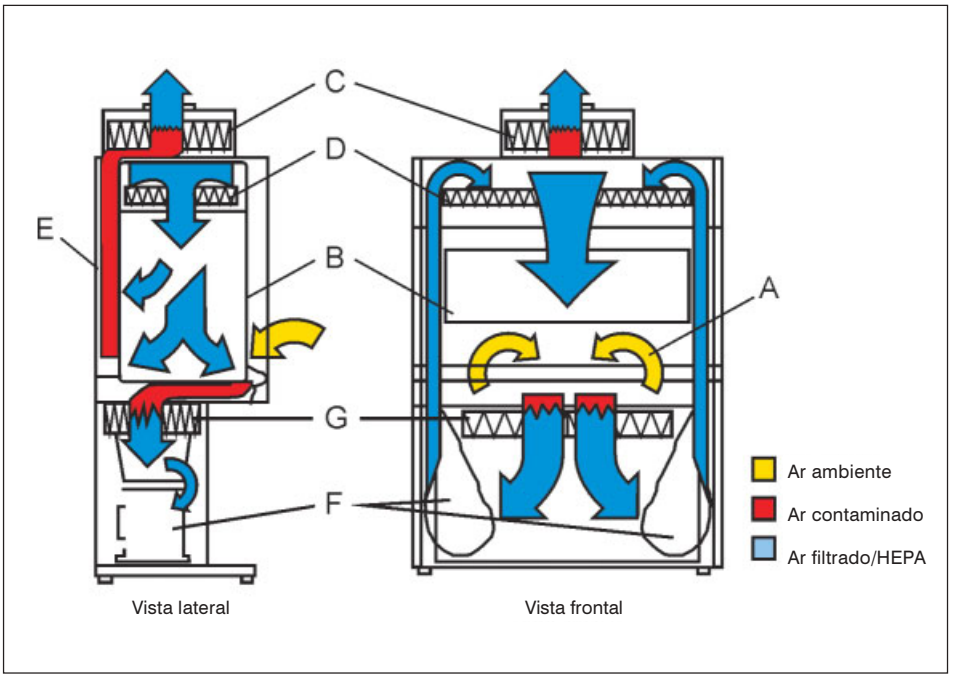


Fig. 34.2 — *Capela de segurança biológica Classe II, tipo B1. A = Abertura frontal; B = Janela; C = Exaustão com filtro HEPA; D = Suprimento de ar com filtro HEPA; E = Exaustão por pressão negativa; F = Motor; G = Filtro HEPA adicional para suprimento de ar. (Fonte: CDC-NIH.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

mais utilizado em laboratórios de nível 2 de biossegurança, pela praticidade e eficiência que representa.

Capela de Segurança Biológica Classe III

As capelas de segurança biológica Classe III foram desenhadas para manipulação de agentes microbiológicos com nível de biossegurança 4, proporcionando máxima proteção ao meio ambiente e ao trabalhador (Fig. 34.3). A capela é hermeticamente fechada, com ventilação própria e construída em aço inoxidável com vidros blindados. O trabalho é efetuado com o uso de luvas de borracha presas à capela. O ar penetra na capela através de filtros HEPA, em série, e circula com trocas de pelo menos 10 vezes/hora. A introdução e retirada de materiais se efetua por meio de câmaras-de-ar com seladores ou autoclaves de porta dupla. O uso deste tipo de capela é limitado devido ao alto custo de instalação e manutenção.

Observações

1. Os filtros HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) são feitos de papel de vidro com 60mm de espessura. As microfibras variam de 0,14 a 14μm.

2. A eficiência é de 99,93% para partículas de 0,3μm de diâmetro.

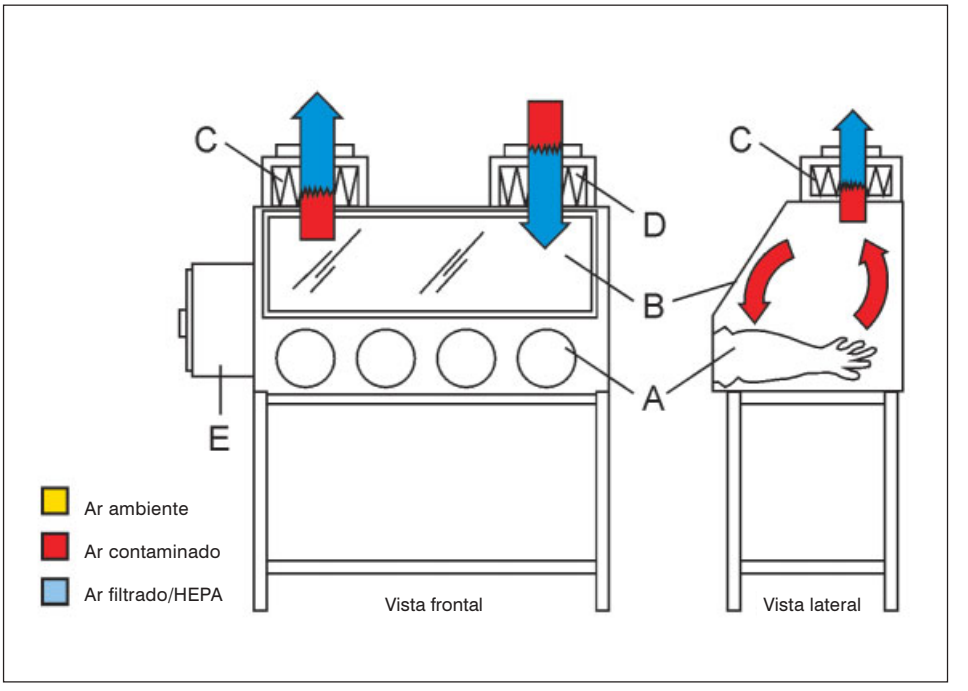


Fig. 34.3 — *Capela de segurança biológica Classe III. A = Entrada para inserção de mãos e braços através de luvas; B = Janela; C = Exaustão com filtro HEPA; D = Suprimento de ar com filtro HEPA; E = Autoclave de porta dupla. (Fonte: CDC-NIH.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CLASSIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS POR CLASSE DE RISCO

Existem vários sistemas de classificações de agentes patogênicos de animais e de seres humanos, de acordo com o dano que representam a um indivíduo ou comunidade. Apesar dessas classificações diferirem umas das outras, todas são baseadas no conceito de que alguns microrganismos são mais perigosos que outros. De forma geral, os critérios para se avaliar em que tipo de classificação o organismo se enquadra leva em consideração sua patogenicidade, via de transmissão, hospedeiro e a aplicação de medidas de prevenção e/ou tratamento efetivo[8]. Segundo a resolução N.º 1 de 1988 do Conselho Nacional de Saúde, Cap. X, Art. 64, os microrganismos são classificados em quatro grupos de risco, de 1 a 4, em ordem crescente de periculosidade.

Grupo de Risco 1

Possui baixo risco individual e coletivo. Representa os microrganismos que nunca foram descritos como agente causal de doenças para o homem e que não constituem risco para o meio ambiente.

Grupo de Risco 2

Apresenta baixo risco individual e risco coletivo limitado. Representa os microrganismos que podem provocar doenças no homem, com pouca probabilidade de alto risco para os profissionais de laboratório. Está associado a doenças humanas, que podem facilmente sofrer ações preventivas e terapêuticas.

Grupo de Risco 3

Representa os agentes com risco individual elevado e risco coletivo baixo, podendo causar enfermidades graves aos profissionais de laboratório. Está associado com doenças sérias ou letais às quais estão disponíveis intervenções terapêuticas e preventivas.

Grupo de Risco 4

Reúne os agentes com alto risco individual e coletivo, que causam doenças sérias ou letais aos seres humanos. Intervenções terapêuticas ou preventivas não são geralmente disponíveis aos agentes deste grupo de risco. Possui agentes patogênicos altamente infecciosos, que se propagam com facilidade e podem causar a morte. No Brasil, ainda não possuímos uma legislação específica que contemple a questão dos agentes microbianos quanto à sua patogenicidade. Desta maneira, seguiu-se a classificação da Bélgica, de 1997 (Tabela 34.1).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Tabela 34.1
Classificação de Diferentes Parasitos Quanto ao Grupo de Risco[8]

	Organismos	*Grupos*	*NB*	*GR*	*PH*	*PA*
1	*Acanthamoeba* spp.	Protozoário		2	+	
2	*Ancylostoma duodenale*	Nematóide	2		+	
3	*Ascaris lumbricoides*	Nematóide	2	2	+	
4	*Babesia* spp.	Protozoário	2	2	+	
5	*Cyclospora cayetanensis*	Protozoário		2	+	
6	*Cryptosporidium parvum*	Protozoário	2	2	+	
7	*Cysticercus cellulosae*	Cestóide	2		+	
8	*Echinococcus granulosus*	Cestóide	2	3	+	+
9	*Entamoeba histolytica*	Protozoário	2	2	+	+
10	*Enterobius vermicularis*	Nematóide	2		+	
11	*Fasciola hepatica*	Trematódeo	2	2	+	+
12	*Giardia lamblia*	Protozoário	2	2	+	
13	*Hymenolepis nana*	Cestóide	2	2	+	
14	*Isospora belli*	Protozoário	2	2	+	+
15	*Leishmania braziliensis*	Protozoário	2	3	+	+
16	*Leishmania donovani*	Protozoário	2	3	+	+
17	*Mansonella ozzardi*	Nematóide		2	+	
18	*Microsporidium* spp.	Protozoário		2	+	
19	*Naegleria fowleri*	Protozoário	2	3	+	
20	*Naegleria gruberi*	Protozoário	1		+	
21	*Nacator americanus*	Nematóide	2	2	+	
22	*Onchocerca volvulus*	Nematóide	2	2	+	
23	*Plasmodium falciparum*	Protozoário	2	3	+	
24	*Plasmodium malariae*	Protozoário	2		+	
25	*Sarcocystis suihominis*	Protozoário	2	2	+	+
26	*Schistosoma mansoni*	Trematódeo	2	2	+	
27	*Strongyloides stercoralis*	Nematóide	2		+	
28	*Taenia saginata*	Cestóide		2,3	+	+
29	*Taenia solium*	Cestóide	2	3	+	+
30	*Toxocara canis*	Nematóide		2	+	+
31	*Toxoplasma gondii*	Protozoário	2	2,3	+	+
32	*Trichomonas vaginalis*	Protozoário		2	+	
33	*Trichostrongylus* spp.	Nematóide		2	+	
34	*Trichuris trichiura*	Nematóide		2	+	
35	*Trypanosoma (S) cruzi*	Protozoário	2	3	+	
36	*Wuchereria bancrofti*	Nematóide	2	2	+	

Abreviaturas: NB= Nível de biossegurança do laboratório no qual o agente deve ser manipulado; GR= Grupo de Risco; PH=Agente patogênico a humanos; PA= Agente patogênico a animais.

PARASITOS

Doenças transmitidas por parasitos têm recebido considerável atenção em países desenvolvidos, devido à importância dessas doenças se disseminarem em viajantes e imigrantes. Muitas pessoas que manipulam estes organismos em laboratórios clínicos e de pesquisa têm sido freqüentemente infectadas. O risco de contaminação dos laboratoristas depende de fatores, como estágios do ciclo de vida dos parasitos, espécies manipuladas e condições de segurança do laboratório em que trabalham[5]. Devido aos acidentes ocorridos em laboratórios serem extremamente ocasionais, não existe uma maneira de se determinar com acurácia o número de pessoas envolvidas. Um estudo do problema, contudo, revelou que a incidência de contaminação

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

aumentou com a descoberta de novos agentes e, cada vez mais pessoas são contaminadas com a manipulação de agentes infecciosos[10]. Dos 4.079 casos de laboratório associados a infecções, reportados por Pike, em 1978, 116 (3%) foram causados por 17 diferentes parasitos. Destes, apenas 64% foram documentados. Na Tabela 34.2 estão representados alguns parasitos causadores de doenças que são comumente adquiridas em laboratórios[5].

Protozoários

Nos últimos anos, tem sido relatado um grande número de infecções associadas ao laboratório com *Plasmodium* spp., *Trypanosoma* spp. e *Leishmania* spp. Apesar de não serem comuns, infecções transmitidas pelo mosquito da malária, em laboratório, também têm ocorrido[2]. Outras fontes diretas de infecção às pessoas que trabalham em laboratório incluem contato com o material contaminado de roedores com leishmaniose cutânea e contato com as fezes ou sangue de animais ou insetos infectados experimentalmente ou naturalmente com *T. cruzi*[5]. Os estágios de infecção podem estar presentes no sangue, fezes, fluido cerebrospinhal, medula óssea ou outros tecidos de biópsia e artrópodes infectados. Dependendo do parasito, as precauções primárias que devem ser tomadas são o cuidado com a ingestão, penetração na pele através de ferimentos, inoculação parenteral acidental e transmissão por vetores artrópodes. Quando se manipulam culturas de *Leishmania* spp., devem ser tomadas precauções quanto à exposição de aerossol à mucosa da membrana dos olhos, nariz ou boca. Para a manipulação desses agentes,

Tabela 34.2
Parasitos Que Podem Ser Transmitidos em Laboratórios

Organismo	*Vias de Infecção*	*Medidas de Prevenção*
Protozoários do Sangue e dos Tecidos		
Acanthamoeba spp.	Ferida, olhos	Luvas, máscara, jaleco, CSB
Babesia spp.	Ferida, agulha, vetor	Luvas
Leishmania spp.	Ferida, agulha, vetor	Luvas, jaleco
Naegleria spp.	Mucosa, aerossol	Luvas, máscara, jaleco, CSB
Plasmodium spp.	Ferida, agulha, vetor	Luvas, jaleco
Sarcocystis spp.	Oral	Luvas, lavagem das mãos
Toxoplasma gondii	Oral, agulha, ferida	Luvas, jaleco
Trypanosoma spp.	Agulha, ferida	Luvas, jaleco
Protozoários Intestinais		
Cryptosporidium parvum	Oral	Luvas, lavagem das mãos
Entamoeba histolytica	Oral	Luvas, máscara, lavagem das mãos
Giardia lamblia	Oral	Luvas, máscara
Helmintos (Nematóides, Cestóides e Trematódeos)		
Ascaris lumbricoides	Oral	Luvas, lavagem das mãos
Enterobius vermicularis	Oral	Luvas, máscara
Hymenolepis nana	Oral	Luvas, lavagem das mãos, máscara
Schistosoma mansoni	Percutânea	Luvas, jaleco
Strongyloides stercoralis	Percutânea	Luvas, jaleco
Taenia solium	Oral	Luvas, lavagem das mãos
Trichuris trichiura	Oral	Luvas, máscara

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

recomenda-se a aplicação das práticas de biossegurança do laboratório nível 2[2].

Infecções associadas ao laboratório com *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica*, *Isospora belli*, *Giardia lamblia*, *Sarcocystis* spp. e *Cryptosporidium* spp. têm sido relatadas[5,9]. Em roedores inoculados experimentalmente com *Toxoplasma* através da rota intraperitoneal, o contato com fluidos peritoneais podem resultar na exposição de organismos infecciosos. Infecções com *Cryptosporidium*, relacionadas a laboratórios, têm ocorrido com freqüência na maioria dos laboratórios que manipulam este agente. Evidências sugerem que pode ocorrer a transmissão de oocistos pelo ar[2]. Os estágios infecciosos podem ser encontrados nas fezes ou em tecidos e em fluidos corpóreos. Exposições de trofozoítos através de aerossóis à mucosa dos olhos, nariz ou boca, podem produzir potencial dano quando houver manipulação de culturas de amebas, como a *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* ou *Balamuthia*, mas o nível de risco ainda é desconhecido. Mulheres com previsão para tornarem-se pregnantes devem receber extensivo aconse-lhamento, devido ao alto risco da toxoplasmose se instalar no feto. A manipulação de oocistos implica em potencial risco de contaminação. A infecção com taquizoítos também apresenta alto risco de contaminação através da mucosa ou abrasões da pele. Para a manipulação desses agentes, recomenda-se a aplicação das práticas de biossegurança do laboratório nível 2[2].

Nematóides

As infecções mais comuns associadas a laboratórios com nematóides compreendem *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis* e *Enterobius vermicularis*[5,6]. Reações alérgicas a vários componentes antigênicos dos nematóides podem representar um risco individual a pessoas sensíveis. Não têm sido relatadas infecções associadas a animais de laboratórios. Cuidado especial com *Trichinella* deve ser tomado se ingerida, quando presente em tecidos contendo larvas. Para a manipulação desses agentes, recomenda-se a aplicação das práticas de biossegurança de laboratório nível 2[2].

Cestóides

Apesar de nenhuma infecção ocasionada com *Echinococcus granulosus* ou *Taenia solium* associada a laboratórios ter sido revelada, as conseqüências deste tipo de infecção, proporcionado pela ingestão de ovos destes organismos, são extremamente danosas e merecem importante atenção. *Hymenolepis nana* é um parasito cosmopolita que não requer um hospedeiro intermediário, sendo transmitido diretamente pela ingestão de fezes de humanos infectados.

Práticas de biossegurança de laboratórios nível 2 devem ser aplicadas como medidas de precaução. Especial atenção deve ser dada às práticas de higiene pessoal (manter as mãos sempre bem limpas)[2].

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Trematódeos

Alguns laboratórios têm relatado infecções com *Schistosoma* spp. e *Fasciola* spp., mas nenhuma associada a animais de laboratório[6]. Os estágios infecciosos do *Schistosoma* spp. (cercária) e *Fasciola* spp. (metacercária) podem ser encontrados, respectivamente, na água, em plantas aquáticas presentes nos aquários de laboratórios, utilizados para manter os hospedeiros intermediários. A metacercária pode ser transferida das mãos à boca através do contato com os dedos, após contato com a vegetação aquática contaminada do aquário. Quanto à contaminação por *Schistosoma* spp., a maioria das exposições ocorridas em laboratórios resultam do contato com cercárias com potencial para causar doença. Como medidas de precaução, devem ser aplicadas as práticas de biossegurança de laboratórios nível 2. Os caramujos e cercárias contidos na água e vegetação dos aquários devem ser descontaminados através de agentes químicos (hipoclorito, etc.) ou fervidos antes de serem descartados[2].

DESCONTAMINAÇÃO DO MATERIAL DE TRABALHO

Descontaminação é definida como sendo a redução dos microrganismos a um nível aceitável. Métodos aplicados a este objetivo podem variar de acordo com o local de trabalho, mas freqüentemente incluem os processos de desinfecção, esterilização e anti-sepsia. A desinfecção é um tipo de controle de infecção muito utilizada em laboratório para limpar superfícies contaminadas. Alguns fatores que afetam a desinfecção incluem[10]:

- Natureza do item a ser desinfetado
- Número de organismos presentes
- Resistência dos microrganismos
- Tipo e concentração de desinfetantes utilizados
- Presença de material orgânico
- Duração da exposição e temperatura.

Diferentes desinfetantes operam por diferentes mecanismos, e alguns são mais efetivos que outros. Desta maneira, não se recomenda o uso contínuo de vários desinfetantes diferentes. Existe um número considerável de agentes químicos utilizados tanto em nível laboratorial quanto nos estabelecimentos de saúde e indústrias, incluindo álcoois, compostos de cloro, formaldeído, glutaraldeído, iodóforos, fenóis sintéticos e compostos quaternários de amônio, entre outros. Entretanto, não existe um desinfetante que atenda a todas as situações e necessidades encontradas, sendo preciso conhecer as características de cada um para se ter subsídios suficientes que permitam a escolha correta do produto, evitando custos excessivos e uso inadequado. A escolha do desinfetante deve levar em consideração aspectos como: espectro de atividade desejada, ação rápida e irreversível, toxicidade, estabilidade e natureza do material a ser tratado. Um resumo das propriedades e aplicações dos desinfetantes é apresentado na Tabela 34.3[1].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO

As boas práticas de laboratório consistem na aplicação de um conjunto de normas e procedimentos de segurança, que visam minimizar os acidentes e melhorar a qualidade do trabalho em clínicas e laboratórios de pesquisa. Abaixo são descritas algumas destas normas[1,4]:

• Manter as mãos sempre limpas e lavá-las após a jornada de trabalho.

• Jamais pipetar com a boca. Utilizar sempre pipetadores automáticos, pêras de borracha e filtros de algodão.

• No laboratório, não fazer refeições, preparar alimentos ou beber.

• No laboratório, não fazer higiene bucal ou maquiagem, não barbear-se, não fumar, não roer as unhas.

• Não guardar alimentos ou artigos de uso pessoal dentro do laboratório.

• Utilizar sempre calçados fechados, que protejam inteiramente os pés.

• Cuidar com a formação de aerossóis e respingos. Quando isto for previsto, utilizar a CSB.

• Quando do uso de luvas, evitar abrir portas ou atender o telefone.

• Utilizar sempre jaleco.

• Quando necessário sair do laboratório, retirar o jaleco, o qual deverá permanecer dentro do laboratório.

• As bancadas de trabalho deverão ser lavadas e desinfetadas antes e depois da rotina de trabalho.

• Procurar concentrar-se quando estiver manuseando agentes patogênicos. Neste momento, não conversar com demais colegas de trabalho.

Tabela 34.3
Propriedades e Aplicações de Alguns Desinfetantes

Desinfetantes Categoria/Tipo	*Características Importantes*										
	Corrosivo	Inflamável	Potencial de Explosão	Resíduo	Inativo por Matéria orgânica	Irritante à Pele	Irritante aos Olhos	Irritante ao Ap. Respiratório	Tóxico
Líquido									
Comp. de Quaternário de amônio					+	+	+		+
Comp. fenólicos	+			+		+	+		+
Comp. de cloro	+			+	+	+	+	+	+
Iodóforos	+			+	+	+	+		+
Álcool etílico		+					+		+
Álcool isopropílico		+					+		+
Formaldeído				+		+	+	+	+
Glutaraldeído				+		+	+	+	+
Gás									
Óxido etileno		+	+			+	+	+	+
Paraformaldeído		+	+			+	+	+	+

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

• Evitar ao máximo o uso de objetos perfurocortantes.

• Quando não for possível evitar o uso de agulhas, descartá-las imediatamente após a aplicação, nunca tentando recolocar o envoltório protetor na agulha.

• Evitar trabalhar sozinho no laboratório, principalmente no período noturno.

• Quando estiver com sono, parar imediatamente a rotina de trabalho e descansar, retornando outra hora.

COMENTÁRIOS

Normas de segurança biológica confiáveis e aplicáveis são um pré-requisito para investimentos privados em pesquisa, assegurados por condições adequadas de proteção à propriedade intelectual. Mesmo na perspectiva de um sistema ágil, que garanta a saúde da população e do meio ambiente, prevê-se ainda longo e custoso trabalho de adaptação das estruturas e produção às normas técnicas. A principal condição de sucesso desse trabalho será sua real capacidade de fiscalizar e obrigar o bom cumprimento dos padrões de segurança adotados, garantindo melhores resultados na qualidade das pesquisas e condições seguras de trabalho à equipe e demais pessoas envolvidas. Boas práticas de laboratório são procedimentos básicos e indispensáveis, devendo ser aplicados por todos que manipulam microrganismos patogênicos, a fim de se evitar riscos de acidentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CDC-NIH. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 3rd ed. Department of Health and Human Services Publications. Washington: US Goverment Printing Office, 1993.
2. CDC-NIH. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 4th ed. Washington: Center for Disease Control and Prevention National Institutes of Health, 1999.
3. EHS. Biosafety Manual, Environmental Health and Safety. University of California Davis: University of California Press, 1996.
4. Grist NR. Manual de Biossegurança para o Laboratório. 2a ed. World Health Organization, Geneva: Livraria Editora Santos, 1995.
5 Herwaldt BL, Juranek D.D. Protozoa and Helminths. In: Fleming DO, Richardson JH, Tulis JI et al. Laboratory Safety. Principles and Pratices. 2nd ed. Washington (DC): ASN Press, 1995.
6. Lettau LA. Nosocomial transmission and infection control aspects of parasites and ectoparasitic diseases. Part I. Introduction/enteric parasites. Infect Control Hosp Epidemiol 12:59-65;111-121, 1991.
7. MSU. Bloodborn Pathogens Exposure Control Plan. Office of Radiation, Chemical and Biological Safety. Michigan: Michigan State University Press, 1999.
8. ORCBS. Biosafety Manual, Office of Radiation, Chemical and Biological Safety. Michigan: Michigan State University Press, 1998.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

9. Pike RM. Laboratory-associated infections: Summary and analysis of 3.921 cases. Health Lab Sci 13:105-114, 1976.

10. Pike RM. Laboratory-associated infections: Incidence, Fatalities, Causes, and Prevention. University of Texas. Health Science Center, Dallas, Texas. Ann Rev Microbiol 33:41-66, 1979.

11. Teixeira P, Valle S. Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora FIOCUZ, 1996.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte



SEÇÃO 10

Identificação e Diagnóstico

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CAPÍTULO 35



Microscopia Óptica

Suzana Bencke Amato

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Um dos principais instrumentos usados no laboratório para se fazer o diagnóstico das parasitoses humanas, é o microscópio óptico. Mas, para que o seu operador possa explorar as qualidades que esse instrumento lhe oferece, ele deve conhecer determinados princípios de óptica, como os que dizem respeito à luz e suas propriedades, bem como as características das lentes que compõem o seu microscópio, como regular sua iluminação para alcançar as melhores condições de observação, e como ele deve ser calibrado, a fim de que possam ser feitas medidas exatas das estruturas observadas.

Loveland[3] apresenta capítulos bem detalhados e completos sobre os princípios da óptica e o microscópio composto, e o leitor poderá encontrar ali, de maneira clara e apropriada, os embasamentos teóricos que necessitar sobre o assunto. A obra de Loveland[3] é na realidade um tratado sobre fotomicrografia, publicada em dois volumes, e nela o autor apresenta inclusive comparações entre marcas conhecidas de microscópios compostos e suas características. Mas, se o leitor não puder ter acesso a estes dois volumes, existem outras fontes bibliográficas que podem ser utilizadas, como, por exemplo, o *The Journal of the Royal Microscopical Society* (Londres) e outros periódicos que publicam trabalhos que envolvem microscopia e que regularmente editam também informações sobre novos desenvolvimentos deste

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

instrumento. Existem ainda duas referências clássicas, Barer[1] e Needhan[4] e os próprios catálogos e publicações dos grandes fabricantes de microscópios compostos.

COMPONENTES DO MICROSCÓPIO ÓPTICO

FONTE LUMINOSA

À medida que os microscópios foram sendo aperfeiçoados, a fonte luminosa passou a ser incorporada ao aparelho; detalhes como dispersão de calor e regulagem de quantidade de iluminação, direção e distância dos raios luminosos foram cuidadosamente calculados no desenho dos aparelhos, de modo a se obter maior eficiência e qualidade de observação. Os microscópios modernos e de boa qualidade usam lâmpadas de halogênio de 20 ou 25 watts.

CONDENSADOR

Esse componente do microscópio tem como função concentrar os raios luminosos dirigindo-os ao objeto que será observado. Quanto mais luz for dirigida sobre o objeto, mantendo-se os limites de conforto visual para o observador, melhor será a resolução da imagem.

Poder de Resolução

Refere-se à habilidade de um sistema óptico de separar dois pontos muito próximos um do outro; ou seja, é a menor distância entre dois pontos. O poder de resolução do microscópio depende da natureza da luz utilizada e da abertura numérica da objetiva que, em geral, é de cerca de 0,25μm nos microscópios compostos. Nos microscópios de melhor qualidade é possível regular a altura do condensador e ao movê-lo verticalmente, estaremos aumentando ou diminuindo a quantidade de luz que estará incidindo sobre o espécime.

No condensador existe um diafragma que tem também a função de regular a passagem de luz. Ao reduzir-se a abertura do diafragma, a quantidade de raios luminosos oblíquos que chega ao espécime é também reduzida e o efeito se traduz em um aumento no contraste da imagem visualizada.

Em alguns microscópios, existe uma lente acessória na parte superior do condensador que é móvel. Essa lente é colocada no trajeto da luz, ou seja, sobre o condensador, quando objetivas de maior aumento estão sendo usadas (40x e 100x) e é retirada durante observações feitas com as objetivas de menor aumento. A função dessa lente acessória é focalizar a luz em um campo mais adequado ao pequeno diâmetro das lentes de maior aumento.

PLATINA

Situada acima do condensador, tem um orifício através do qual passam os raios luminosos e tem a função de receber a lâmina com a preparação

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

que será examinada ao microscópio. Em um trabalho, como o diagnóstico parasitológico, é importante que a platina tenha um *charriot*, pois esse mecanismo, além de segurar a lâmina de maneira firme, permite que o observador a mova com segurança e de forma suave, para os lados e para frente e para trás. Na maioria dos *charriots* existem escalas *vernier* que permitem ao observador anotar a exata posição onde o espécime foi observado, ou algum detalhe ao qual precise retornar após mover a lâmina. Entretanto, é preciso ter em mente que a posição deve ser anotada, lendo-se na escala *vernier*, vertical e horizontal, o ponto que queremos marcar.

Objetivas

Talvez as peças mais importantes do microscópio sejam as objetivas, pois de seu tipo e qualidade dependerá a qualidade de desempenho do microscópio.

Cada objetiva é formada por lentes e elementos que variam em número, tipo e qualidade. A função da objetiva é coletar os raios luminosos que passam pelo objeto e formar uma imagem aumentada e real do objeto observado. Entretanto, a imagem irá ser formada a uma distância acima da objetiva, distância que geralmente fica entre 160 e 170mm, e que corresponde ao comprimento mecânico do tubo, ou seja, a distância em milímetros desde a superfície onde está rosqueada a objetiva até a ocular. As objetivas têm marcada a distância, 160 ou 170mm, e geralmente têm escrito ao lado desse valor a espessura da lamínula.

Existem diversos tipos de objetivas e elas variam em construção, qualidade e, obviamente, em preço. As objetivas mais simples, são as chamadas *acromáticas*, podendo ser usadas para rotina. Essas objetivas são capazes de corrigir aberrações cromáticas para duas cores, o vermelho e o azul. Entretanto, quando determinadas observações exigem a percepção de detalhes em coloração, torna-se necessário incluir na objetiva lentes que podem ser feitas de fluorita. Essas objetivas, chamadas de *fluoritas*, são capazes de corrigir aberrações para um número maior de cores do espectro luminoso.

As objetivas *apocromáticas* são as que apresentam um maior número de correções. Cromaticamente elas corrigem três ondas luminosas — verde, vermelho e azul — e esfericamente são corrigidas em duas ondas luminosas. Usando um número maior de elementos feitos de tipos de vidro e minerais, elas são capazes de corrigir aberrações cromáticas e esféricas. As objetivas apocromáticas são chamadas de *plano anapocromáticas*; quando o campo de visualização é perfeitamente plano, de margem a margem; essas são as objetivas ideais para serem usadas em fotomicrografia.

As objetivas apresentam inscrições que especificam suas características, tais como:

160/0.17 — 160 refere-se ao comprimento do tubo mecânico, e 0.17, à espessura da lamínula.

NPL FLUOTAR — NPL refere-se à objetiva tipo plano normal, ou seja, a que oferece um campo visual plano de pelo menos 18mm de diâmetro; FLUOTAR refere-se à correção para aberração cromática.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

100/1.32 Oel — indica o aumento de 100X e 1,32 de abertura numérica; Oel indica que essa é uma objetiva de imersão, ou seja, deve ser usada com óleo de imersão.

Portanto, para conhecer as características das objetivas utilizadas em um determinado microscópio, basta ler as inscrições que existem na própria objetiva.

Abertura Numérica das Objetivas

O poder de resolução de um sistema óptico, como o microscópio, depende da onda luminosa que incide sobre o objeto e da abertura numérica da objetiva; portanto outra característica importante sobre a qualidade da observação é a abertura numérica. A abertura numérica, N.A., é expressa como:

N.A. = n x sin u

onde *n* corresponde ao índice de refração do meio entre a lamínula e a superfície da lente, isto é, ar, água ou óleo de imersão, e *u* é o ângulo que se forma entre o eixo óptico de uma lente e o raio mais externo que pode entrar na lente da frente. Portanto, quanto maior a abertura numérica da objetiva, maior será o poder de iluminação e, portanto, melhor será o poder de resolução da objetiva.

Objetivas de Imersão

São as objetivas de 100X, que têm uma abertura numérica alta (e maior poder de resolução) e, portanto, necessitam de um fluido para preencher o espaço entre a objetiva e a preparação que será observada ao microscópio. O óleo de cedro tem um índice de refração de 1,5070, mas à medida que seca e oxida seu índice de refração eleva-se e ele se torna amarelado, mais espesso e grudento. O óleo que é vendido para microscopia é deixado "secar" até que seu índice de refração alcance 1,515.

Hoje existem óleos de imersão sintéticos que substituem com vantagem o óleo de cedro e que têm índices de refração de 1,515. Os fabricantes de microscópios ao desenhar e padronizar os seus aparelhos, já prevêem também o óleo de imersão adequado às características do seu microscópio; assim, a própria companhia recomenda uma determinada marca de óleo de imersão, ou fornece o óleo de cedro por ela processado. De acordo com Loveland[3], a *American Optical Company* recomenda o uso do óleo de imersão "*Crown Immersion*"; a Bausch & Lomb, o *Shillaber's* A; a E. Leitz, o óleo de cedro processado pela Leitz; e a Zeiss também recomenda o óleo de cedro processado por ela própria.

A Importância do Uso de Lamínula com Espessura Correta

Os microscópios americanos têm sido desenhados para usar lamínulas de 0,180mm de espessura e os europeus para lamínulas de 0,170mm. Mas

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

os produtores de lamínulas, normalmente, as vendem de acordo com a classe de espessura; assim, no mercado se encontram lamínulas de classes 1, 2 e 3, e mais recentemente surgiram no mercado americano lamínulas de classe 1½, cuja espessura padrão é de cerca de 0,180mm. Infelizmente, no mercado brasileiro existem diversos fabricantes de lamínulas que não têm o cuidado de indicar a espessura de seu produto e, na maioria das vezes, os laboratórios biológicos trabalham com lamínulas de espessura não conhecida. Talvez por desconhecer a importância de utilizar lamínulas de espessura correta e apropriada ao seu equipamento óptico, o observador não obtém a qualidade total que o seu equipamento óptico pode lhe oferecer. Mais acentuado se torna o problema quando se pretende fotografar o objeto estudado, pois a qualidade de resolução da fotomicrografia será prejudicada pelo uso de lamínulas espessas.

Oculares

As oculares são lentes desenhadas para aumentar a imagem produzida pela objetiva e são designadas pela capacidade de aumento que produzem. Elas representam a última etapa no percurso óptico através do microscópio. A primeira ocular foi desenhada por Christiam Huygens e era uma lente plano-convexa, seu desenho foi tão apropriado que é ainda utilizado; entretanto, as oculares modernas são compostas por duas lentes ou dois sistemas de lentes e sua montagem é feita de tal maneira que, além de produzirem o aumento da imagem gerada pela objetiva, façam também a correção para aberrações, em especial as aberrações cromáticas. Nas oculares podem ser inseridos retículos, ou escalas, que são usados para medições.

Como as objetivas, as oculares também possuem inscrições que mostram as suas características, como, por exemplo:

PERIPLAN GF 10x/18 — Periplan (desenvolvida pela Leitz) indica que é uma ocular capaz de compensar cerca de 0,8% da cor lateral e oferece um campo visual um pouco maior.

GF 10x/18 — corresponde ao campo visual da ocular, ou seja, a superfície da imagem intermediária do tubo, que é apreciada com a ocular. Essa superfície será percebida de forma ampliada pelo fator da ocular. O diâmetro da imagem vista com uma ocular GF 10x/18 será equivalente ao diâmetro de uma superfície de 10 x 18, ou seja, 18mm, a uma distância de 250mm do observador.

Aumento Final Dado Pelo Microscópio

Para calcular o aumento total dado pelo microscópio, multiplicamos o valor do aumento da objetiva pelo valor do aumento da ocular e pelo valor do fator de tubo. O valor do fator de tubo deve estar marcado no microscópio, mas quando não estiver, considera-se seu valor como sendo 1,0. Em microscópio onde estejam inseridos tubos de desenho, ou câmaras fotográficas, é preciso multiplicar também o valor destes equipamentos, para obter o aumento total. Esses valores sempre estão gravados nestes equipamentos.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

ILUMINAÇÃO KÖHLER

É a iluminação crítica, aquela que oferece a melhor condição para observação, ou seja, aquela em que a fonte luminosa é focalizada pelo condensador no mesmo plano do objeto.

Para que possamos usar este ajuste crítico da iluminação o microscópio precisa ter um diafragma de campo e um diafragma do condensador, a fonte de iluminação deve ser de baixa voltagem e de filamento curto e compacto. A regulagem da iluminação deve ser feita para começar com objetiva de 10x e com a preparação sobre a platina. O condensador deve ser totalmente levantado, o diafragma de campo deve ser fechado e o diafragma do condensador deve ser fechado em 2/3. A seguir, baixa-se o condensador até que se tenha uma imagem nítida do diafragma de campo. Se for necessário centraliza-se a imagem e abre-se o diafragma de campo e do condensador até obter-se a iluminação ideal.

MORFOMETRIA FEITA COM MICRÔMETRO OCULAR

O micrômetro ocular é um retículo de vidro colocado a meio caminho entre as duas lentes da ocular. Ao comprar um retículo, é importante que se tenha certeza que ele poderá ser inserido em uma das oculares do microscópio. Ao comprar-se um microscópio é bom confirmar se uma das suas oculares vem com o retículo para medidas. Se você for colocar um retículo na ocular do seu microscópio, lembre-se de que a superfície gravada deve ser colocada voltada para cima e, ao segurá-lo, faça-o apenas tocando nas suas bordas. Além disso, o retículo deve permanecer fixo na ocular. A escala do retículo é dividida por linhas muito finas em 50 ou 100 unidades.

Antes de fazer qualquer medida ao microscópio, este deve ser calibrado, isto é, para cada objetiva do microscópio registra-se o valor a que corresponde uma divisão do micrômetro ocular. A calibragem é feita pela sobreposição da escala do micrômetro ocular com a escala do micrômetro objetivo (lâmina própria para este fim, com escala conhecida).

A escala do micrômetro objetivo geralmente tem 2mm de comprimento e está dividida em 200 unidades de 0,01mm, ou seja, 10μm cada. Assim, com o micrômetro objetivo sobre a platina, focaliza-se a escala e roda-se a ocular de modo a fazer com que as escalas dos dois retículos se sobreponham e a primeira linha do micrômetro ocular (a que marca o 0) é colocada sobre uma linha da escala do micrômetro objetivo que será considerada como 0. Não é necessário começar com a primeira linha do retículo da lâmina, embora isso possa tornar mais fácil a contagem das unidades.

Para calibrar o micrômetro ocular é aconselhável usar-se a escala inteira ou a porção mais longa que ofereça dois pontos perfeitamente coincidentes com duas linhas quaisquer sobre a escala do micrômetro objetivo. Na Fig. 35.1, 31 unidades das 50 unidades do micrômetro ocular equivalem a 18 unidades (180μm) do micrômetro objetivo. Portanto, cada unidade do micrômetro ocular equivale a 5,8μm (180μm/31). A escala inteira, com as 50 unidades ocupa o equivalente a 291μm; portanto, cada unidade do

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

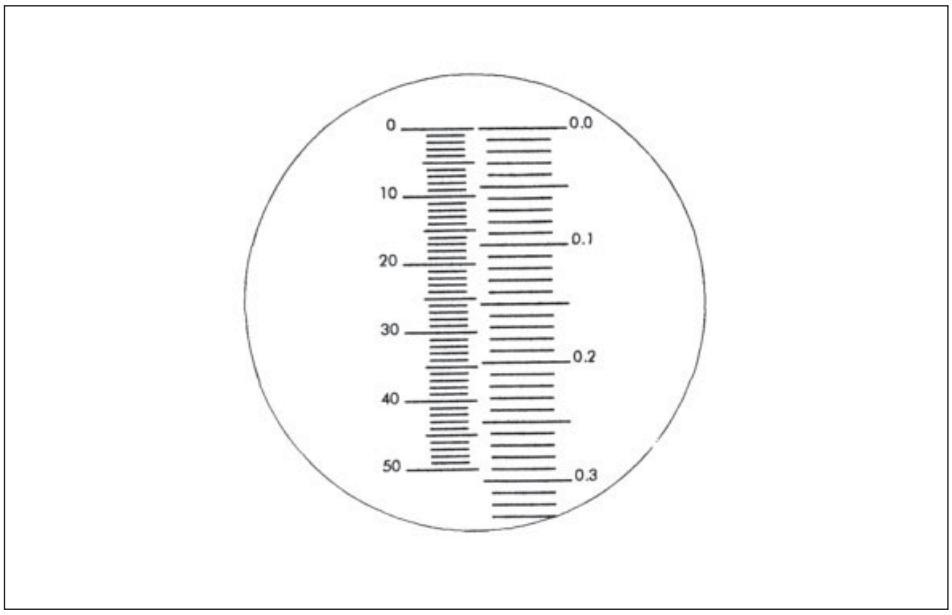


Fig. 35.1 — *Campo visual mostrando a sobreposição do retículo do micrômetro ocular (à esquerda) com o retículo do micrômetro objetivo (à direita).*

micrômetro ocular equivale a 5,8μm (291μm/50). Dessa forma calcula-se o número de micrômetros que uma divisão do micrômetro ocular, em um determinado aumento, possui. Para tornar mais acurado esse valor, recomenda-se que para cada objetiva se procurem várias coincidências entre os dois retículos e faça-se uma média entre os valores calculados. Esse valor médio corresponderá a uma divisão do micrômetro ocular, para a objetiva utilizada. Esse procedimento deverá ser realizado para cada uma das objetivas do microscópio.

Uma vez conhecido o valor em micrômetros para cada divisão do micrômetro ocular, basta contar quantas divisões do micrômetro ocular mede uma determinada estrutura e multiplicar esse número pelo valor em micrômetros da unidade correspondente à objetiva utilizada na observação.

Como o aumento de algum objeto visualizado através do microscópio depende do valor da ocular, do valor da objetiva, do fator de tubo e também de qualquer outro equipamento colocado entre a ocular e a objetiva, como, por exemplo, um tubo de desenho ou máquina fotográfica, deve se ter o cuidado de calibrar o microscópio após o mesmo ter sido montado na sua forma definitiva, pois qualquer equipamento interposto entre ocular e objetiva irá alterar o aumento total produzido pelo aparelho.

González-Ruiz e Bendall[2] enfatizam a importância das medidas precisas dos ovos de helmintos e dos cistos de protozoários no diagnóstico parasitológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barer R. Lecture notes on the use of the microscope. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1956.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. González-Ruiz A, Bendall RP. Size Matters: The use of the ocular micrometer in diagnostic parasitology. Parasitol Today 11:83-85, 1992.

3. Loveland RP. Photomicrography. A comprehensive treatise. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1 e 2 v, 1970.

4. Needhan GH. The practical use of the microscope. Springfield (Ill): Charles C Thomas Publisher, 1958.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CAPÍTULO 36



Blastocystis hominis

Geraldo Attilio De Carli
Marilise Brittes Rott

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O *Blastocystis hominis* foi descrito por Brumpt[5] como um habitante do trato intestinal humano, tendo como sinonímia *Coccidium jalinum* Perroncito 1901, pro parte e *Blastocystis enterocola* Alexeieff 1911, pro parte[1,2]. Durante anos o *B. hominis* foi classificado como um organismo relacionado com o *Blastomyces* spp. ou como uma forma cística de flagelado ou uma levedura do gênero *Schizosaccharomyces*[1,3,12,18, 21-23]. Gradwoohl e Kourí[15], Burrows[6], Kudo[18] e Golvan e Drouhet[14] consideraram esse microrganismo como um fungo, o qual ocorria com muita freqüência nos espécimes fecais, e as pequenas formas eram freqüentemente confundidas com cistos de protozoários intestinais, principalmente as amebas. Esses organismos, como as bactérias intestinais patogênicas, não podem ser reconhecidos morfologicamente; conseqüentemente, devem ser isolados e identificados por técnicas especiais. Zierdt e cols.[26-34] estudaram o organismo e o reclassificaram como protozoário, sugerindo sua classificação em uma nova classe Blastocystea e em uma nova ordem Blastocystida[31]. Em 1989, Johnson[16], usando o seqüenciamento de rRNA, não conseguiu confirmar a classificação proposta por Zierdt, como também colocá-lo em definitivo em um grupo taxonômico. Em 1987, Chen[8] não encontrou evidências de uma resposta sorológica relacionada com a presença desses protozoários nas fezes. A análise de 10 cepas de

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

B. hominis isoladas de fezes humanas revelou dois grupos distintos de organismos. As proteínas dos dois grupos eram imunologicamente diferentes e estudos de hibridação mostraram que o conteúdo de DNA dos dois grupos eram desiguais[4]. Diferenças ultra-estruturais encontradas entre as cepas de *B. hominis* poderão trazer informações adicionais na classificação[10]. Diferentes autores aceitam que o *B. hominis* apresenta três formas morfológicas: vacuolar, granular e amebóide. A forma vacuolar é esférica, medindo de 4 a 15μm de diâmetro, sendo caracterizada por um grande vacúolo central, o qual é também chamado de corpo central, em função da microscopia eletrônica ter revelado que não é uma estrutura vazia. O organismo apresenta uma fina borda de citoplasma com um a quatro núcleos e muitos grânulos.[25] Os lipídios, o amido, a celulose ou o glicogênio do vacúolo não se coram. Uma fina e delicada cápsula é vista rodeando o organismo nesta fase. A forma granular mede de 10 a 60μm de diâmetro. Essa estrutura é predominante nas culturas, mas também é observada nas fezes. A grande diferença entre essa forma e a vacuolar é a grande presença de pequenos grânulos na área vacuolar. A forma amebóide é irregular, medindo de 2,6 a 7,8μm de diâmetro, com um ou dois pseudópodes, um ou dois núcleos e, usualmente, não contém o vacúolo central. Bactérias ingeridas pelo organismo podem ser vistas nos corpos tipo lisossomas dentro do citoplasma. A forma amebóide pode se transformar na forma vacuolar e vice-versa[25]. O *B. hominis* modifica a sua forma pela emissão e retração de pseudópodes. Estudos recentes mostraram que a predominância nas fezes não é a forma vacuolar, mas pequenas estruturas incluindo as formas multivacuolares (5 a 8μm) e formas avacuoladas (5μm). As formas pequenas contêm de um a dois núcleos, mas a cística pode ter mais de quatro núcleos. Alguns autores não aceitam a existência da forma cística[25]. A reprodução realiza-se de forma assexual, por divisão binária ou por esporulação[2,15,21]. A membrana central, limitando o corpo (anteriormente chamada de vacúolo), ocupa 90% da célula e participa dos processos de reprodução sexuada e assexuada. A área do corpo central pode ser corada por vários métodos de coloração ou permanecer clara. As outras estruturas, com função desconhecida, ainda não foram definidas. Os organismos se assemelham, no tamanho e na forma, com os cistos de amebas, mas essas células diferem, nitidamente, na organização interna. O *B. hominis* com a forma de amebas é ocasionalmente visto nas fezes diarréicas, apresentando variações no tamanho e grande dificuldade para a identificação. O *B. hominis* apresenta as seguintes características de protozoário[26]: A) *Estruturais:* a) não possui parede celular, mas uma fina membrana com vesículas e poros; b) apresenta mitocôndria e aparelho de Golgi; c) mantém uma estável endossimbiose em todas as condições de crescimento; d) exibe uma atividade lenta de pseudópodes; e) reprodução por divisão binária ou esporulação; f) núcleo eucariótico bem definido com um distinto cariossoma e uma bem definida membrana nuclear; g) retículo endoplasmático liso e irregular, muito bem demarcado. B) *Fisiológicas*: a) anaeróbio estrito; b) necessita de bactérias para o crescimento, sendo capaz de ingerir bactérias e outros detritos, exceto quando sujeito à axenização em condições estritamente controladas; c) não cresce no ágar e nos meios usados para o cultivo das bactérias e fungos; d) temperatura ótima de crescimento 37°C, não se desenvolve a 24°C; e) ingere bactérias e outras partículas; f) apresenta

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

preferência pelo pH neutro, mas morre em pH ácido; e g) resistente às altas concentrações de anfotericina B. Estudos realizados por Markell e Udkow[22,23] mostraram em um inquérito coprológico, com aproximadamente 180 pessoas assintomáticas e com igual número de pessoas sintomáticas, a mesma incidência de *B. hominis* em ambos os grupos. A presença do organismo em grande número e a ausência de outros parasitos, bactérias ou vírus podem ser a causa de diarréia, cólicas, náuseas, febre, vômito e dores abdominais, havendo a necessidade de tratamento[7,9,11,12,17,19,23,24]. Em pacientes sintomáticos, nos quais não foi identificado nenhum agente etiológico, o *B. hominis* poderia ser considerado como um possível patógeno. Estudos recentes sugerem que quando uma infecção sintomática pelo *B. hominis* responde à terapêutica, a melhora, provavelmente, representa a eliminação de outros organismos patogênicos não detectados (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* ou *Dientamoeba fragilis*). A autópsia de um paciente imunodeficiente, na Alemanha, mostrou numerosos *B. hominis* organizados em colônias e fixados na superfície do intestino grosso. Nesse mesmo país, a prevalência e a significância clínica do organismo em um grande número de pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi investigada, aparentando uma infecção oportunista secundária e não-invasiva[25]. Até que não existam evidências mais convincentes da patogenicidade, a presença do *B. hominis* nas fezes não pode ser considerada mais significante do que a *Iodamoeba bütschlii* ou *Endolimax nana*. Conseqüentemente, a participação desse organismo em termos de colonização ou de doença continua sendo bastante controvertida.

DIAGNÓSTICO DE LABORATÓRIO

O *B. hominis* é identificado no material fecal não corado e em esfregaços permanentes corados pelas colorações do tricrômico, Giemsa, Wright ou hematoxilina férrica. A coloração pelo tricrômico é a mais usada; entretanto, a coloração pelo Giemsa apresenta melhores resultados para a demonstração dos núcleos. É aconselhado o exame pela microscopia de contraste de fase, visto que o exame a fresco pode não revelar os organismos[13]. A solução de iodo é indicada para a coloração da suspensão fecal, podendo facilitar o encontro dos organismos[25]. Quando o número de organismos é grande e a identificação apresentar problemas, o *B. hominis* deve ser cultivado[20] para ulterior identificação pela microscopia óptica ou pela microscopia eletrônica. O meio de cultura de escolha é uma modificação do meio de ovo total coagulado (clara e gema) com uma porção inclinada (bisel), coberta pela solução de Locke com 30% de soro de cavalo[25].

OBSERVAÇÕES

1. O *B. hominis* pode ser destruído quando as fezes frescas forem lavadas com água corrente, antes da fixação, apresentando, conseqüentemente, resultados falso-negativos.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

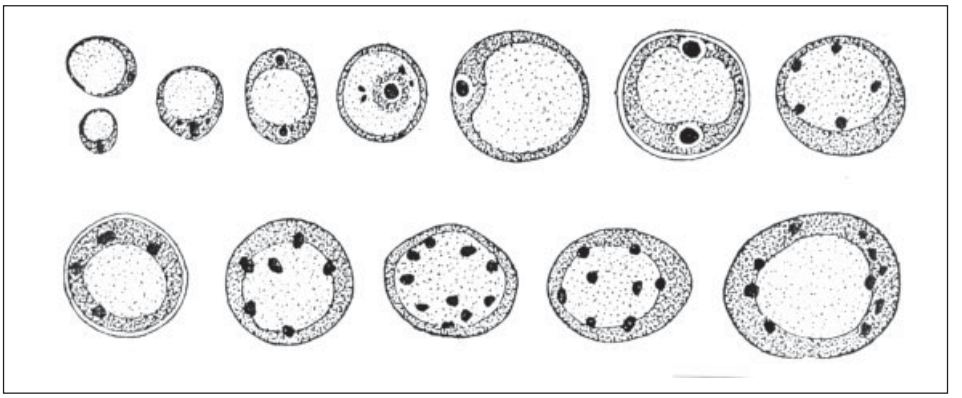


Fig. 36.1 — Blastocystis hominis — *Formas encontradas nas fezes, aumento 1.800X. (Segundo Brumpt E, Neveu-Lemaire N. Travaux Pratiques de Parasitology. Paris: Masson et Cie Editeurs; 1958).*

2. Os organismos deverão ser quantificados em raros, poucos, moderados ou muitos. No mínimo três exames das fezes para a pesquisa de ovos e outras formas de parasitos (incluindo esfregaços permanentes corados) deverão ser realizados para assegurar a ausência de outros protozoários antes de atribuir os sintomas ao *B. hominis.* A presença de outros agentes microbianos deverá também ser considerada.

3. Visto que pequeno número de *B. hominis*, com freqüência, pode causar sintomas clínicos, os laboratórios devem reportar o encontro dos organismos somente quando o número é > 5/cada 40 campos microscópios observados[25].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alexeleff A. Sur la nature des formations dites "Kystes de *Trichomonas intestinalis*". C R Soc Bi 71:296-298, 1911.
2. Alexeleff A. Sur la cycle evolutif et les affinites de *Blastocystis enterocola*. Arch Zool Exp 56:113, 1917.
3. Argão H. Etudes sur les *Blastocystis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 15:143-151, 1922.
4. Borehan PF, Upcroft JÁ, Dunn LA. Protein and DNA evidence for 2 zimodemes of *Blastocystis hominis* from humans. Int J Parasitol 22:49-53, 1992.
5. Brumpt E. *Blastocystis hominis* n. sp. et formes voisines. Bull Soc Pathol Exot 5:725-730, 1912.
6. Burrows RB. Microscopic Diagnosis of the Parasites of Man. New Haven: Yale University Press, 1965.
7. Casemore DP, Armstrong M, Hackson FB. Clinical relevance of *Blastocystis hominis*. Lancet i:1234, 1984.
8. Chem J. Lack of serum immune response to *Blastocystis hominis*. Lancet 2:1021, 1987.
9. Doyle PW, Helgason MM, Mathias RG, Proctor EM. Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis*. J Clin Microbiol 28:116-121, 1990.
10. Dunn LA, Boreham PFL, Stenzel, DL. Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. Int J Parasitol 19:43-56, 1989.
11. Dunn LA, Boreham PFL. The in-vitro activity of drugs against *Blastocystis hominis*. J Antimicrob Chemother 27:507-516, 1991.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

12. Garcia LS, Bruckner DA, Clancy MN. Clinical relevance of *Blastocystis hominis*. Lancet ii:1223-1234, 1984.

13. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3nd ed. Washington (DC): ASM Press, 1997.

14. Golvan YJ, Drouhet E. Techniques en Parasitologie et en Mycologie. Paris: Flammarion Médicine-Science, 1972.

15. Gradwohl RBH, Kouri P. Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. Parasitology and Tropical Medicine. 4th ed. St. Louis, CV Mosby Co.,1948. v.3.

16. Johnson AM. *Blastocystis hominis*: Phylogenetic affinities determined by rRNA sequence comparison. Exp Parasitol 68:283-288, 1989.

17. Knowles R, Das Grupta BM. On the nature of *Blastocystis hominis*. Indian J Med Res 12:31-38, 1924.

18. Kudo RR. Protozoology. 5th ed. Springfield, Ill: Charles C. Thomas, 1971.

19. Lee MG, Rawlins SC, Didier M et al. Infective arthritis due to *Blastocystis hominis*. Ann Rheun Dis 49:192-193, 1990.

20. Lynch KM. *Blastocystis hominis* in culture. Am J Trop Med 2:215-215, 1922.

21. Lynch KM. Cultivation of *Blastocystis hominis* species and determination of species. Am J Trop Med 2:539-549, 1922.

22. Markell EK, Udkow MP. *Blastocystis hominis*: pathogen or fellow traveler? Am J Trop Med Hyg 35:1023-1026, 1986.

23. Markell EK, Voge M, John DT. Medical Parasitology. 7th ed. Philadephia (Pa): WB. Saunders Co., 1992.

24. Ricci N, Toma P, Furiani M et al. *Blastocystis hominis*. Lancet i:1234, 1984.

25. Sun T. Parasitic Disorders. Pathology, Diagnosis, and Management. 2nd ed. Baltimore, Williams & Willkins, 1999.

26. Zierdt CH, Rude WS, Bull BS. Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. Am J Clin Pathol 48:495-501, 1967.

27. Zierdt CH, Williams R. *Blastocystis hominis*: Axenic cultivation. Exp Parasitol 36:233-243, 1974.

28. Zierdt CH, Tan HK. Endosymbiosis in *Blastocystis hominis*. Exp Parasitol 39:430-442, 1976.

29. Zierdt CH, Tan HK. Ultrastructure and light microscope apperance of *Blastocystis hominis* in a patient with enteric disease. Arch Parasitenkd 50:277-283, 1976.

30. Zierdt CH, Tan H. Endosymbiosis in *Blastocystis hominis*. Exp Parasitol 39:422-430, 1976.

31. Zierdt CH. *Blastocystis hominis*, an intestinal protozoan parasite. Public Health Lab 36:147-161, 1978.

32. Zierdt CH, Swan JC, Hosseini J. In vitro response of *Blastocystis hominis* to antiprotozoal drugs. J Parasitol 30:332-334, 1983.

33. Zierdt CH, Swan JC, Hosseini J. In vitro response of *Blastocystis hominis* to antiprotozoal drugs. J Parasitol 30:332-334, 1983.

BIBLIOGRAFIA ADICIONAL

1. Ashford RW, Atkinson EA. Epidemiology of *Blastocistys hominis* infection in Papua New Guinea: age-prevalence and associations with other parasites. Arm Trop Med Parasitol 86:129-136, 1992.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Church DL, Sutherland IR, Gill MJ et al. Absence of an association between enteric parasites in the manifestations and pathogenesis of HIV enteropathy in gay men. Scand J Infect Dis 24:567-575, 1992.

3. Doyle PW, Helgason MM, Mathias RG et al. Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis.* J Clin Microbiol 28:116121, 1990.

4. Kukoschke KG, Müller HE. Varying incidence of *BIastocystis hominis* in cultures from faeces of patients with diarrhoea and from bealths persons. Zentrabl Bakteriol 277:112-118, 1992.

5. Kukoschke KG, Neeker A, Müller HE. Detection of *Blastocystis hominis* by direct microscopy and culture. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 9:305-307, 1990.

6. Lambert M, Gigi J, Bughin C. Persistent diarrhoea and *Blastocystis hominis.* Acta Clin Belg 47:129-130, 1992 (Letter)

7. Llibre JM, Tor J, Manterola JM et al. *Blastocystis hominis*: chronic diarrhoea in AIDS patients. Lancet i: 221, 1989 (Letter)

8. Logar J, Andlovic A, Poijsak-Prijatelj M. Incidence of *Blastoeystis hominis* in patients with diarrhoea. J Infect 28:151-154, 1994.

9. MacPherson DW, MacQueen WM. Morphological diversity of *Blastocystis hominis in* sodium acetate-acetic acid-formalin-preserved stool samples stained with iron hematoxylin. J Clin Microbiol 32:267268, 1994.

10. Nimri L, Batchoun R. Intestinal colonization of symptomatic, as symptomatic schoolchildren with *Blastocystis hominis.* J Clin Microbiol 32:2865-2866, 1994.

11. Ponce de León, P, Svetaz MJ, Zdero M. Importancia del diagnóstico de *Blastocystis hominis* en el examen parasitológico de heces. Rev Lat-Microbiol. 33:159-164, 1991.

12. Stenzel DJ, Borcham PFI, McDougall R. Ultrastructure of *BIastocystis hominis* in human stool samples. Int J Parasitol 21:807-812, 1991.

13. Tan KSW, Ng GC, Ng E et al. *Blastocystis hominis:* A simplified, high-efficiency method for clonal growth on solid agar. Exp Parasitol 96:9-15, 2000.

14. Udkow MP, Markell EK. *Blastocystis hominis:* prevalence in asymptomatic versus symptomatic hosts. J Infect Dis 168:242-244, 1993.

15. Vadovenko A. *Blastocystis hominis:* origin and significance of vacuolar and granular forms. Parasitol Res 86:8-10, 2000.

16. Zierdt CH. Studies of *Blastocystis hominis.* J Protozool 20:114-121, 1973.

17. Zierdt CH, Tan HK. Ultrastructure and light microscope appearance of *Blastocystis hominis* in a patient with enteric disease. Z Parasitenkd 50:277-283, 1976.

18. Zierdt CH. *Blastocystis hominis,* a long-misunderstood intestinal parasite. Parasitol Today 4:15-17, 1988.

19. Zierdt CH. *Blastocystis hominis*-past and future. Clin Microbiol Rev 4:61-79, 1991.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CAPÍTULO 37



Pneumocystis carinii

Luiz Carlos Severo

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O *Pneumocystis carinii* foi descrito como protozoário. Esta crença foi amplamente difundida em decorrência da resposta à sulfamidoterapia e à impossibilidade de isolamento em cultivo. Contudo, estudos de microscopia eletrônica[6] e genéticos[2,13] reclassificaram o *P. carinii* como levedura não brotante, com afinidade ascomicética, embora com aspectos diferentes dos comumente isolados nos laboratórios de Microbiologia Clínica[12]. A posição sistemática do organismo é a seguinte: filo: Ascomycota; ordem: Pneumocystidales; família: Pneumocystidaceae e gênero: *Pneumocystis*. A correta posição do microrganismo tem importância prática, uma vez que uma micose pulmonar difere de uma protozoose nos aspectos epidemiológicos, clínicos, fisiopatológicos e histopatológicos. Embora já se tivesse conhecimento de que o *P. carinii* causava pneumonia no paciente imunodeprimido, este problema somente assumiu proporções preocupantes na década de 1980, com o surgimento da pandemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS). Cerca de 85% dos pacientes com SIDA/AIDS desenvolvem pneumocistose, sendo considerada a principal infecção oportunista nestes pacientes[7].

ABORDAGEM DIAGNÓSTICA

Pneumonia por *P. carinii* deve fazer parte do diagnóstico diferencial para todo o paciente imunodeprimido que apresente

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

febre, sintomas respiratórios e infiltrado pulmonar ao raios X de tórax. Embora achados de história, exame físico, estudos de imagem e anormalidades de testes laboratoriais possam sugerir o diagnóstico de pneumocistose, nenhum destes achados é definitivo na caracterização etiológica. O diagnóstico continua apoiado na eficiente colheita do espécime clínico do local infectado. Como, até o momento, não foi possível isolar o *P. carinii* em cultivo, a caracterização da infecção continua sendo baseada na demonstração das formas teciduais do fungo. Uma ampla gama de colorações está disponível, com variada sensibilidade, custo e complexidade. A escolha destas técnicas depende do espécime clínico a ser analisado, bem como da experiência e preferência do técnico do laboratório diagnóstico. O método de Grocott[5] é o mais amplamente utilizado em laboratórios clínicos por ser específico e sensível.

Colheita do Espécime Clínico

O lavado broncoalveolar (LBA) é técnica rápida e segura para colheita do material pulmonar e que mais freqüentemente tem sido usada no diagnóstico da pneumocistose. O material é obtido quando alíquotas de solução salina são injetadas na periferia do pulmão, através de brônquio subsegmentar com a subseqüente aspiração por intermédio do fibrobroncoscópio, tomando amostras de milhões de alvéolos. Tem sido proposto, como alternativa para crianças que estão no ventilador, LBA não-broncoscópico, usando tubo de polietileno French n.º 8 e administrando solução salina a 0,85% em quatro alíquotas de 5ml. Convém salientar que o médico deve estar seguro de que o material é representativo do espaço alveolar e de que a colheita foi radiologicamente orientada. O material deve ser processado em citocentrífuga. A qualidade da amostra pode ser avaliada por técnicas citológicas, pelo número de macrófagos presentes no espécime clínico[8].

Diagnóstico Etiológico

Histopatologia e Citologia

Tipicamente a pneumonia por *P. carinii* compromete alvéolos com edema e infiltra o interstício com linfócitos. Uma evidência histopatológica indireta da infecção fúngica é o material floculento alveolar, fruto da descamação dos pneumócitos lesados pelo fungo, considerado como marca registrada da infecção. Este diagnóstico é feito por técnicas de rotina da histopatologia (hematoxilina e eosina, H-E) e da citopatologia (Giemsa e Papanicolaou). A coloração de Papanicolaou, com lâminas bem preparadas em citocentrífuga, garante excelente sensibilidade, inclusive permitindo o diagnóstico de outras entidades não-fúngicas. Contudo, este achado característico é observado em infecções avançadas no paciente profundamente imunodeprimido (SIDA/AIDS). As formas atípicas não são reveladas por estas técnicas. Nestes casos, o método de escolha é o Grocott[5].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Coloração pela Prata de Grocott

O Grocott[5] é um teste histoquímico para glicogênio e mucina. Pelo contato com o ácido crômico, os grupos hidroxilas de complexos polissacarídeos da parede celular do fungo são oxidados a aldeído, que é reduzido pelo complexo alcalino e o nitrato de prata-metenamina, corando o *P. carinii* de marrom. O glicogênio tecidual não cora devido a sua fácil solubilidade em meio aquoso, enquanto a mucina é identificada em elementos glandulares, com a cor cinza-escuro. A coloração de fundo é verde-claro. Ver a modificação rápida da técnica[9].

Outras Técnicas de Diagnóstico

a. **Método de Giemsa**. A coloração de Giemsa, disponível em qualquer laboratório, tem a vantagem da rapidez e de ser seu próprio controle. Isto é, se as células sangüíneas estão apropriadamente coradas, também estará o *P. carinii*. Contudo, neste método a busca do fungo é tediosa e demorada, principalmente na presença de poucos microrganismos (ver Capítulo 12).

b. ***Calcofluor***. Método extremamente rápido e de baixo preço é o do branco de *calcofluor* (Sigma). Trata-se de procedimento pela microscopia fluorescente e não-imunológica. Embora de alta sensibilidade, deve ser feito o diagnóstico diferencial dos outros fungos que também aparecem fluorescentes[3].

c. **Anticorpos Monoclonais**. Os métodos associando a sensibilidade da microscopia e a especialidade da imunologia têm sido empregados para evidenciar o *P. carinii*[4,11]. Vários são os métodos que utilizam anticorpos monoclonais. Entre eles, citam-se Merifluor (*Meridian Diagnostics*), Fluoroslide (*Disease Detection International*) e *Genetic System*. Este último apresenta maior sensibilidade (96%) e é de fácil leitura, enquanto os outros dois possuem sensibilidade de 87%.

d. **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).** Mais recentemente, a introdução da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) abriu um novo horizonte no diagnóstico e na pesquisa da pneumocistose[1]. As técnicas de amplificação do DNA podem ser usadas inclusive para o escarro induzido. Estas técnicas são mais sensíveis que as colorações teciduais. Porém, esta abordagem diagnóstica permanece em investigação, em laboratórios de referência, especialmente com respeito à especificidade diagnóstica, uma vez que há casos de infecção subclínica[10]. Ademais, são técnicas demoradas, muito especializadas e de alto custo para o paciente.

A Tabela 37.1 apresenta o resumo comparativo entre os diferentes métodos de diagnóstico.

Método Rápido de Coloração pela Prata

O método rápido de coloração pela prata foi descrito por Grocott[5].

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Tabela 37.1
Métodos de Identificação

Coloração	*S (%)*	*E (%)*	*Tempo*	*Custo*	*Uso*
Coloração pela prata	95	95	1h	++	+++
Coloração de Papanicolaou	80	90	30min	+	+++
Calcofluor	90	95	1min	+	++
Imunofluorescência	95	95	1h	+++	++
PCR	95	?	1-2d	++++	+

S = sensibilidade, E = especificidade.

Amostras

Biópsia pulmonar a céu aberto, biópsia transbrônquica (BTB), lavado broncoalveolar (LBA), aspirado transtraqueal, escarro induzido e escarro espontâneo.

Reagentes

1. Ácido crômico (CrO_3)
2. Borato de sódio (Bórax) ($Na_2B_4O_7.10H_2O$)
3. Metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$)
4. Metenamina ($C_6H_{12}N_4$)
5. Nitrato de prata ($AgNO_3$)
6. Cloreto de ouro ($HAuCl_4.3H_2O$)
7. Verde-claro-amarelado (*Light Green SF Yellowish*) (CI 42095) ($C_{37}H_{34}N_2O_9S_3Na_2$)
8. Dimetilsulfóxido (DMSO) (C_2H_6SO)
9. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
10. Hidrogenossulfito de sódio ($NaHSO_3$)
11. Tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3.5H_2O$)
12. Álcool etílico absoluto (C_2H_6O)
13. Álcool etílico a 95% (C_2H_6O) (v/v)
14. Xilol (Xileno) (C_8H_{10})

Preparação das Soluções

1. Solução de Ácido Crômico a 5% (m/v)

Ácido crômico	5g
Água destilada-deionizada	100ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

2. Solução de Borato de Sódio a 5% (m/v)

Borato de sódio	5g
Água destilada-deionizada	100ml

3. Solução de Metabissulfito de Potássio a 1% (m/v)

Metabissulfito de potássio	1g
Água destilada-deionizada	100ml

4. Solução de Metenamina a 3% (m/v)

Metenamina	3g
Água destilada-deionizada	100ml

5. Solução de Nitrato de Prata a 5% (m/v)

Nitrato de prata	5g
Água destilada-deionizada	100ml

6. Solução Estoque de Prata Metenamina

Solução aquosa de metenamina a 3%	100ml
Solução aquosa de nitrato de prata a 5%	5ml

• Forma-se um precipitado branco, imediatamente dissolvido pela agitação. Armazenar a 4°C. Validade de cerca de seis meses.

7. Solução de Uso de Prata Metenamina

Solução aquosa de borato de sódio a 5%	2ml
Água destilada-deionizada	25ml
Solução estoque de prata metenamina	25ml

8. Solução de Uso de Cloreto de Ouro a 0,1%

Cloreto de ouro	0,1g
Água destilada-deionizada	100ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

9. Solução Estoque de Verde-claro-amarelado

Verde-claro-amarelado	0,2g
Água destilada	100ml
Ácido acético glacial	0,2ml

10. Solução de Uso Verde-claro-amarelado

Solução estoque de verde-claro-amarelado	10ml
Água destilada-deionizada	40ml

11. Solução de Tiossulfato de Sódio a 2%

Tiossulfato de sódio	2g
Água destilada-deionizada	100ml

Coloração da Amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas do procedimento.

2. Usar cubas de *Coplin* nas diferentes etapas da coloração.

3. Desparafinar os cortes histológicos, em estufa à temperatura de 64°C, cinco minutos.

4. Imergir em xilol, 10 minutos.

5. Imergir em álcool absoluto, um minuto.

6. Imergir em álcool a 95%, um minuto.

7. Imergir em água destilada-deionizada, 10 minutos.

• Lâminas sem parafina: imergir em água destilada-deionizada, 10 minutos.

8. Imergir as lâminas em ácido crômico (oxidação) e aquecer até a temperatura de 64°C, um minuto.

9. Deixar as lâminas esfriarem e lavar três vezes com água destilada-deionizada.

10. Imergir as lâminas em solução de metabissulfito de potássio a 1%, um minuto.

11. Lavar as lâminas três vezes com água destilada.

12. *No momento do uso, misturar em* beaker *15ml de dimetilsulfóxido (DMSO) com a solução de uso de prata metenamina. Imergir as lâminas e aquecer até a temperatura de 74°C.*

13. Controlar todo o procedimento de coloração, observando a lâmina de controle de qualidade ao microscópio; caso esta esteja bem corada prosseguir

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

o método de coloração; caso contrário, imergir novamente as lâminas para o diagnóstico na solução de DMSO + solução de uso de prata metenamina durante um minuto. Repetir essa etapa quantas vezes forem necessárias.

14. Deixar as lâminas esfriarem e lavar três vezes com água destilada-deionizada.

15. Imergir as lâminas em solução de cloreto de ouro a 0,1%, um minuto.

16. Lavar as lâminas três vezes com água destilada.

17. Imergir as lâminas em tiossulfato de sódio a 2%, um minuto.

18. Lavar as lâminas três vezes com água destilada.

19. Imergir as lâminas em solução de verde-claro-amarelado, um minuto (coloração de fundo).

20. Desidratação: álcool a 95% (um minuto); álcool absoluto (um minuto), xilol (15 minutos ou mais).

21. Montar com resina sintética (*Cytoseal* 60, Mounting Medium, Low Viscosity).

Controle de Qualidade

1. Corar um esfregaço preparado com *P. carinii* em paralelo com a lâmina do material colhido do paciente. A lâmina-controle deve ser examinada para determinar a qualidade do procedimento de coloração.

2. Quando possível controlar todo o procedimento de coloração antes de usar as soluções para o diagnóstico.

3. A solução dimetilsulfóxido (DMSO) + solução de uso de prata metenamina deve ser preparada no momento do uso.

4. Preparar as soluções e lavar as lâminas com água destilada-deionizada.

5. A solução de uso de prata metenamina deve estar clara sem contaminação visível.

6. Quando a lâmina montada estiver opaca, a desidratação e a clarificação com o xilol não foram adequadas. Retirar a lamínula e repetir as etapas 20 e 21 com os álcoois e xilol frescos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Calendo AM, Hewitt PL, Allega JM et al. Performance of a PCR assay for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens. J Clin Microbiol 36:979-982, 1998.

2. Edman JC, Kovacks JA, Masur H et al. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be member of the fungi. Nature 334:519-522, 1988.

3. Fraire AE, Kemp B, Greenberg SD et al. Calcofluor white stain for the detection of *Pneumocystis carinii* in transbronchial lung biopsy specimens: a study of 68 cases. Mod Patol 9:861-864, 1996.

4. Fraser JL, Lilly C, Israel E et al. Diagnostic yield of bronchoalveolar lavage and

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

bronchoscopic lung biopsy for detection of *Pneumocystis carinii*. Mayo Clin Proc 71:1025-1029, 1996.

5. Grocott RG. A stain for tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. Am J Clin Pathol. 25:975-979, 1955.
6. Haque A, Plattner SB, Cook RT et al. *Pneumocystis carinii*. Taxonomy as viewed by electron microscopy. Am J Clin Pathol 87:504-510, 1987.
7. Hopewell PC. *Pneumocystis carinii* pneumonia:diagnosis. J Infect Dis 157:1115-1119, 1988.
8. Kirsch CM. The diagnostic strategy for *Pneumocystis carinii* pneumonia. Is doing less better than doing more? Chest 113:1443-1445, 1998.
9. Maham CT, Sale GE. Rapid methenamine silver stain for *Pneumocystis* and fungi. Arch Pathol Lab Med 102:351-352, 1978.
10. Metersky M. *Pneumocystis carinii*. Forgotten but not gone? Chest 114: 1232-1233, 1998.
11. Stager CE, Fraire AE, Kim H-S et al. Modification of the fungi-fluor and the genetic systems fluorescent antibody methods for detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens. Arch Pathol Lab Med 119:142-147, 1995.
12. Stringer JR. *Pneumocystis carinii*: what is it, exactly? Clin Microbiol Rev 9: 489-498, 1996.
13. Ypma-Wong MF, Fonzi WA, Sypherd PS. Fungus-specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*. Infect Immun 60:4140-4145, 1992.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CAPÍTULO 38



Diagnóstico e Identificação de Parasitos

Geraldo Attilio De Carli
Tiana Tasca

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A Parasitologia Clínica estuda os organismos que parasitam o homem e que podem se tornar patogênicos para os seus hospedeiros, podendo resultar em problemas bastante pronunciados. Os parasitos humanos estão classificados em sete grandes grupos, incluindo Protozoários (amebas, flagelados, ciliados, esporozoários, coccídios e microsporídios), Nematóides, Trematódeos, Cestóides, Pentastomídeos, Acantocéfalos e Artrópodes. Os Pentastomídeos, Acantocéfalos e Artrópodes não serão discutidos neste capítulo.

PROTOZOÁRIOS INTESTINAIS

Os protozoários parasitos do intestino humano pertencem a cinco grupos: amebas, flagelados, ciliados, coccídios e microsporídios. Com exceção de alguns microsporídios, a totalidade dos organismos vive no trato intestinal. Tais espécies variam quanto à prevalência e patogenicidade, sendo algumas comensais ou não-patogênicas. Os protozoários intestinais apresentam ciclos evolutivos relativamente simples. O homem se infecta ao ingerir cistos, oocistos ou esporos, presentes nos alimentos e na água contaminada com fezes, ou bradizoítos encontrados na carne de bovinos ou de suínos infectada com sarcocistos maduros ou pelo contato boca-a-boca (*Entamoeba gingivalis*). A maior parte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

dos protozoários intestinais vive no cólon, com exceção do flagelado *Giardia lamblia* e dos coccídios *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli* e *Sarcocystis* spp., que habitam o intestino delgado. A maioria dos parasitos intestinais é diagnosticada pelo exame das fezes, embora outros materiais, como urina, escarro, secreções urogenitais, aspirados, tecidos, conteúdo duodenal e espécimes obtidos por biópsia, possam ser utilizados para a identificação de certas espécies. Os estágios usuais de diagnóstico dos protozoários são os trofozoítos, cistos, oocistos e esporos. Na realidade, uma identificação segura e correta de um protozoário depende de critérios morfológicos, os quais estão sujeitos a uma colheita bem-feita e a uma boa preservação dos espécimes[2-5].

AMEBAS

Várias espécies de amebas intestinais vivem no ceco e no cólon do homem: *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *Iodamoeba bütschlii* e *Blastocystis hominis*. A *Entamoeba polecki* é uma ameba intestinal dos porcos e dos macacos, ocasionalmente é encontrada no homem causando diarréia. A espécie *Entamoeba gingivalis* habita a cavidade bucal. Algumas espécies de vida livre são encontradas nas fezes, mas não são consideradas parasitos intestinais. A *Dientamoeba fragilis* foi classificada como flagelado, apesar das formas flageladas não serem encontradas nas fezes. Os trofozoítos desse organismo amebóide são destruídos pela água, trazendo dúvidas de como esse parasito pode resistir à passagem pelo estômago. Esse protozoário possui somente o estágio de trofozoíto, não há formação de cisto. Cada espécie de ameba tem características em comum com as outras espécies do gênero, tornando a identificação muitas vezes difícil. A *E. histolytica* é o agente etiológico da amebíase, sendo a única ameba patogênica para a espécie humana. A presença de outras amebas parasitando o homem, apesar de não trazerem repercussões clínicas, indica a ingestão de alimentos sólidos ou líquidos contaminados com fezes. As infecções são adquiridas pela ingestão de cistos, que desencistam no intestino. O exame direto a fresco é um procedimento simples e eficiente para o estudo das fezes, permitindo observar as formas trofozoíticas vivas dos protozoários. Os trofozoítos em preparações salinas usualmente apresentam a forma amebóide. Em preparações fixadas esses organismos são freqüentemente arredondados, mas podem apresentar forma irregular ou alongada. As diferentes espécies de amebas que habitam o trato intestinal humano se diferenciam pelo tamanho do trofozoíto e do cisto, pela estrutura e número dos núcleos dos cistos e pelo número e forma das inclusões citoplasmáticas (vacúolos nos trofozoítos e corpos cromatóides nos cistos)[2-5] (Fig. 38.1).

O diagnóstico de laboratório diferencial entre a *Entamoeba histolytica* e a *Entamoeba dispar* não pode ser realizado tomando como base a morfologia (estudo de esfregaços fecais permanentes corados), a não ser que sejam vistas hemácias ingeridas pelos trofozoítos (*E. histolytica*)[3, 4, 5].

E. histolytica e a *E. dispar* são morfologicamente idênticas, mas espé-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

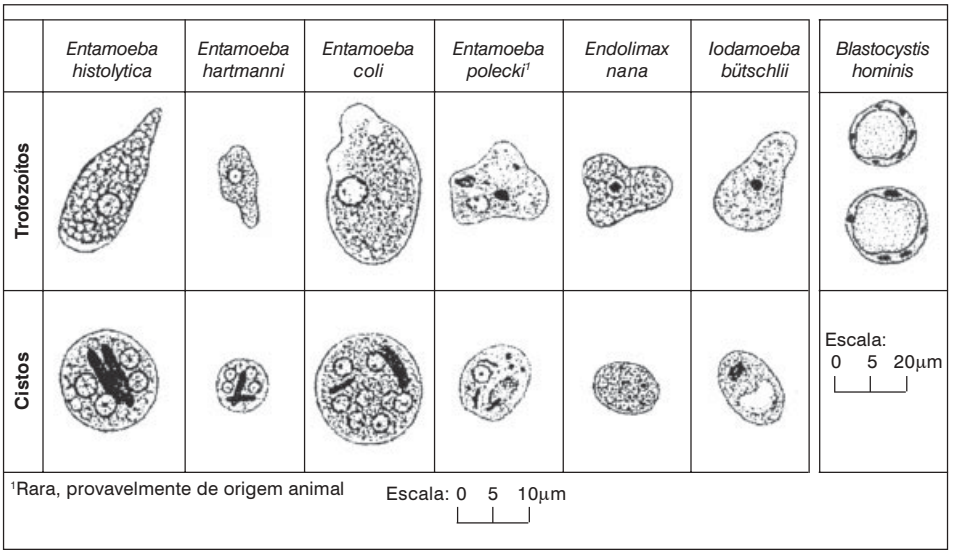


Fig. 38.1 — *Amebas encontradas nos espécimes fecais humanos. (Adaptada e reproduzida. Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

cies geneticamente distintas. Não existem evidências de invasão tissular ou inflamatória do cólon associada com a *E. dispar*. Na ausência de eritrócitos fagocitados, a patogênica *E. histolytica* é morfologicamente indistinguível da não-patogênica *E. dispar*[3-5]. A tendência moderna é voltar a essa concepção dualista, revalidando o nome *E. dispar* para a espécie não-patogênica[14,15]."

Flagelados

Quatro espécies de flagelados habitam o trato intestinal: *Giardia lamblia*, *Chilomastix mesnili*, *Trichomonas hominis* e *Dientamoeba fragilis*. Em raras ocasiões podem ser identificados outros protozoários menores, como a *Enteromonas hominis* e a *Retortamonas intestinalis*. Dessas espécies somente a *G. lamblia* é considerada patogênica, enquanto a patogenicidade da *D. fragilis* ainda não foi definida. O *Trichomonas tenax*, comensal, vive na cavidade bucal humana. O *Trichomitus fecalis* só foi encontrado em um único paciente e não existe certeza se o homem seria o seu hospedeiro primário. Apesar de ser encontrado em fezes diarréicas, o *T. hominis* é considerado não-patogênico, assim como o *C. mesnili*. Todos os tricomonadídeos não possuem a forma cística, somente a trofozoítica. Com exceção da *Dientamoeba*, os flagelados são identificados facilmente pelas suas características de motilidade. A maioria das espécies vivas dos flagelados é piriforme, elipsóide ou oval e, algumas vezes, esférica, possuindo flagelos cujo número e disposição variam segundo as espécies. O disco adesivo ou disco suctorial e os axonemas da *Giardia*, a estrutura do citóstoma alongado do *Chilomastix* e a membrana ondulante dos *Trichomonas* são características morfológicas diferenciais importantes para a identificação dos organismos. A *D. fragilis* não apresenta a forma cística; entretanto, esse protozoário caracteriza-se por possuir um ou dois núcleos sem cromatina periférica, mas com

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

quatro a oito grânulos de cromatina em sua massa central. Esse flagelado apresenta tamanho e forma variável, contendo grande quantidade de bactérias ingeridas e outros restos de alimentos[2-5] (Fig. 38.2).

Ciliados

O *Balantidium coli* é o maior dos protozoários parasitos do homem e o único ciliado patogênico encontrado no cólon. Seus trofozoítos e cistos são encontrados nas fezes. Os trofozoítos vivos possuem um movimento rotatório geralmente rápido e direcional. A superfície do organismo está coberta por cílios dispostos em fileiras helicoidais e o citoplasma contém um macronúcleo ou núcleo vegetativo, grande e riniforme. Um segundo núcleo, o micronúcleo, fica situado na região deprimida do macronúcleo. O número de núcleos no cisto é o mesmo no trofozoíto[2-5].

Coccídios

Os coccídios intestinais dos gêneros *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Isospora* e *Sarcocystis* são parasitos intracelulares obrigatórios, que habitam a mucosa do intestino delgado do homem. Os gêneros *Cryptosporidium* e *Cyclospora* constituem dois grupos de protozoários parasitos, responsáveis por gastrenterite transitória. A infecção por *I. belli*, ou isosporose, tem sido diagnosticada em pacientes com SIDA/AIDS. A maioria dos protozoários intestinais é transmitida na contaminação fecal dos alimentos e líquidos. Entretanto, o homem é infectado pelo *Sarcocystis hominis* e *Sarcocystis suihominis* pela ingestão, respectiva, de carne de bovinos ou de suínos, crua ou malcozida, contaminada com sarcocistos maduros contendo bradizoítos. As infecções pelo gênero *Sarcocystis* ocorrem em uma variedade de hospedeiros, incluindo o homem. A sarcocistose não é uma doença muito bem conhecida no homem. Os oocistos maduros e os esporocistos livres desses coccídios são transparentes e de difícil visualização em esfregaços não corados, necessitando de coloração especial para serem identificados[2] (ver Capítulo 10) (Fig. 38.3).

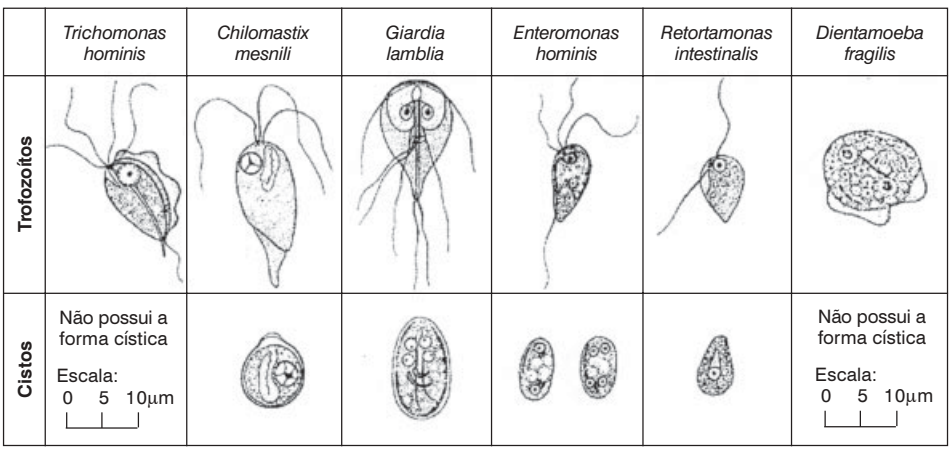


Fig. 38.2 — *Flagelados encontrados nos espécimes fecais humanos. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

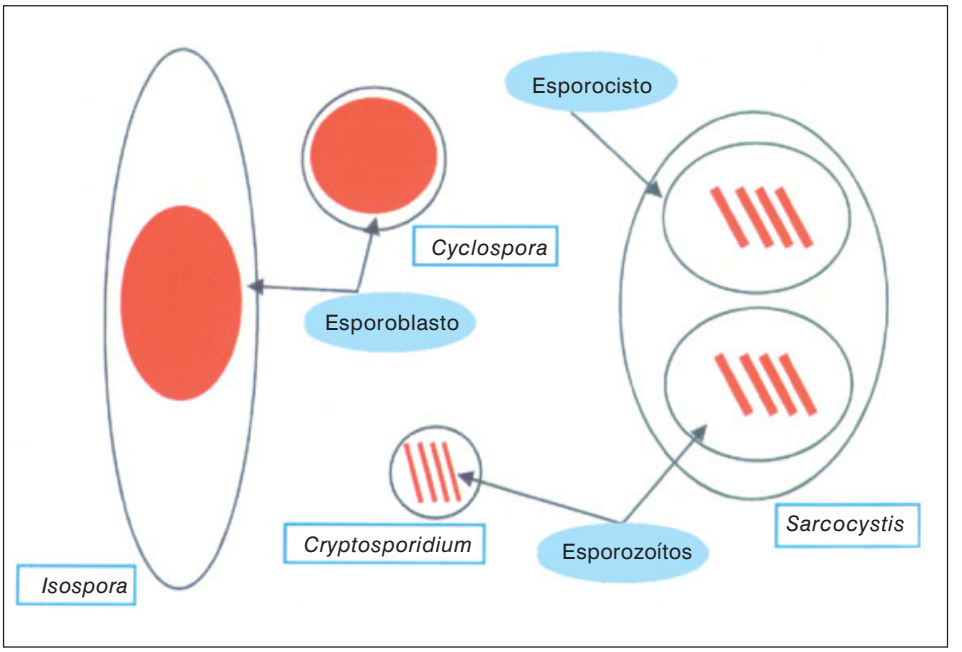


Fig. 38.3 — *Oocistos de coccídios humanos. (Segundo Lushbaugh B.* Coccidia & Microsporidia *[on line]. Disponível em <URL: http://fiona.umsmed.edu> (1999 Jun 27.)*

Microsporídios

No momento os protozoários que apresentam grandes problemas para o diagnóstico são os microsporídios (variando em tamanho entre 1 e 2,5μm). Os microsporídios são parasitos intracelulares obrigatórios, dos vertebrados e invertebrados, caracterizados pela produção de esporos e pela presença do túbulo polar. A infecção da célula hospedeira se inicia quando um estímulo apropriado determina a expulsão do túbulo polar, o qual penetra na membrana da célula hospedeira, permitindo a libertação do esporoplasma no interior da célula. As fases subseqüentes à reprodução e à formação dos esporos terminam com a ruptura da célula hospedeira e a libertação dos esporos. As infecções humanas são adquiridas pela ingestão de pequenos esporos ovóides. Cinco gêneros de microsporídios estão relacionados com essas infecções, mas somente as espécies *Enterocytozoon bieneusi* e *Encephalitozoon* (*Septata*) *intestinalis* permanecem como parasitos intestinais, apesar da *E.* (*S.*) *intestinalis* se disseminar através de outros tecidos. Estudos subseqüentes mostraram que o *E. bieneusi* pode colonizar além dos enterócitos do intestino delgado e o epitélio do canal biliar[2-5] (ver Capítulo 11).

PROTOZOÁRIOS COM DIFERENTES LOCALIZAÇÕES

Amebas

Com exceção da *Entamoeba gingivalis* (com localização na cavidade bucal), as amebas não-intestinais patogênicas, organismos de vida li-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

vre, podem estar associadas com ambientes quentes e com água fresca. Esses protozários têm sido encontrados no sistema nervoso central (SNC), nos olhos e em outros fluidos orgânicos. A espécie *Naegleria fowleri* é conhecida como a causa primária da meningoencefalite amebiana primária (MAP), que é quase sempre fatal. Outra espécie, como a *Acanthamoeba*, eventualmente patogênica, produz quadros clínicos muito diversos, como encefalite amebiana granulomatosa (EAG), ceratite (CA) e lesões ulcerativas da córnea[4,5].

Flagelados

A espécie *Trichomonas vaginalis* habita o trato geniturinário do homem e da mulher, onde produz a infecção, que é transmitida pela relação sexual. O *T. tenax* é um protozoário comensal, com ampla distribuição geográfica, que habita a cavidade bucal do homem[4,5].

Coccídios

Os coccídios são parasitos responsáveis por graves infecções de particular importância nos pacientes imunocomprometidos. Esses organismos se disseminam do trato intestinal para outras localizações do corpo humano. A maioria dos indivíduos pode apresentar poucos sintomas. Nos pacientes imunocompetentes os sintomas variam de raros a ausentes; entretanto, nos indivíduos imunodeprimidos, em especial os pacientes altamente suscetíveis à infecção, as seqüelas podem ser muito sérias, com risco de vida[4,5].

Microsporídios

Os microsporídios apresentam grandes dificuldades para o diagnóstico de laboratório. Esses organismos se disseminam do intestino para diferentes locais do corpo humano. Atualmente existe uma emergente evidência da ligação dos microsporídios com as doenças em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e de sua seqüela, a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS)[4,5].

PROTOZOÁRIOS DO SANGUE E DOS TECIDOS

A malária continua sendo a doença mais comum em muitas regiões do mundo, principalmente nas áreas tropicais e subtropicais, onde são diagnosticados, anualmente, de 200 a 300 milhões de novos casos, com dois a três milhões de mortes, sendo a maioria crianças. Em países onde a malária não é endêmica, o diagnóstico pode apresentar inúmeros problemas, especialmente em viajantes não-imunes infectados, nos quais freqüentemente ela não é diagnosticada. O *Plasmodium vivax* e o *Plasmodium falciparum*, das quatro espécies que infectam o homem,

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

apresentam uma prevalência de ~95% e ~80%, respectivamente. Outras formas de transmissão além do vetor incluem a transmissão de sangue, o uso de seringas, agulhas contaminadas e acidentes em laboratório. A infecção congênita tem sido raramente descrita. O reconhecimento do espectro da doença causada pelos organismos do gênero *Babesia* é o resultado do aumento de novos casos relatados. A transmissão é feita por carrapatos da família Ixodidae, além da transmissão pelo sangue. As principais espécies envolvidas são *Babesia bigemina, B. microti* e *B. divergens*[4,5] (ver Capítulos 15 e 16).

As leishmanioses são infecções parasitárias que ocorrem em inúmeras espécies animais, incluindo o homem, sendo causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. A transmissão do parasito ao hospedeiro vertebrado ocorre pela picada de fêmeas de dípteros (flebotomíneos) pertencentes à família Psychodidae (ver Capítulo 14). Várias espécies causam as leishmanioses cutâneas do Velho Mundo, as leishmaníoses cutâneo-mucosas do Novo Mundo e a leishmaniose visceral. Os tripanossomos são hemoflagelados que vivem no sangue e nos tecidos. A transmissão por vetores ocorre de diferentes formas. As tripanossomíases africanas (tripanossomíase pelo Trypanossoma brucei gambiense e *T. brucei rhodesiense*) são devidas à inoculação das formas tripomastigotas infectantes do flagelado, que se encontram na saliva das moscas do gênero *Glossina* (tsé-tsé). Enquanto que a tripanossomíase por *Trypanossoma cruzi* (doença de Chagas) é transmitida pela penetração dos tripomastigotas metacíclicos, eliminadas nas fezes e urina do vetor (principalmente o *Triatoma infestans, Rhodnius prolixus e Panstrongylus megistus*), durante ou logo após a hematofagia, em solução de continuidade da pele ou mucosa íntegra[4,5,14,15] (ver Capítulo 13).

NEMATÓIDES

Nematóides Intestinais

Os nematóides *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis* e *Trichuris trichiura* vivem no trato intestinal e são potencialmente patogênicos. A forma primitiva do processo de reprodução são os ovos, em estado inicial de desenvolvimento embrionário (*A. lumbricoides, T. trichiura, A. duodenale, N. americanus*), depositados no solo junto com as fezes. Em certas espécies as fêmeas não ovipõem, incubando os ovos no útero (*E. vermicularis*); em outras (*S. stercoralis*), a incubação ovular ocorre no hospedeiro, onde as fêmeas partenogenéticas vivem mergulhadas nas criptas da mucosa duodenal. Todos os nematóides intestinais têm desenvolvimento direto, apresentando somente um hospedeiro. A transmissão para um novo hospedeiro depende da ingestão dos ovos maduros infectantes (*Ascaris* e *Trichuris*) ou pela penetração de larvas infectantes por via transcutânea (ancilostomídeos e *Strongyloides*). O ciclo evolutivo dos gêneros *Trichuris* e *Enterobius* é, eminentemente, intestinal, enquanto os gêneros *Ascaris, Ancylostoma, Necator*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

e *Strongyloides* apresentam desenvolvimento intestinal com migração pulmonar[4,5,8,17] (Fig. 38.4).

Nematóides dos Tecidos

O diagnóstico dos nematóides dos tecidos apresenta muitas dificuldades, principalmente quando um único espécime do organismo é obtido por biópsia e/ou por autópsia e a diagnose deve ser baseada no exame de preparações histológicas[4,5,8,15].

Nematóides do Sangue e dos Tecidos

A transmissão dos nematóides dos tecidos e do sangue (filárias) se dá por um mosquito vetor. Os vermes adultos vivem nos tecidos e nos vasos e gânglios linfáticos do hospedeiro vertebrado. O diagnóstico é realizado pela demonstração da presença do parasito (microfilárias) no sangue, em outros líquidos orgânicos e na pele[4,5,8,15] (ver Capítulos 18 e 19).

CESTÓIDES

Cestóides Intestinais

As três espécies mais comuns de cestóides parasitos do intestino delgado do homem são: *Taenia solium*, *Taenia saginata* e *Hymenolepis nana*, todas de distribuição mundial. As tênias parasitas (*Taenia* spp.), com exceção da *H. nana*, onde um simples hospedeiro é suficiente para o desenvolvimento da larva e do adulto, requerem um hospedeiro intermediário (bovino ou suíno), onde o estágio de larva se desenvolve depois da ingestão dos ovos, e um hospedeiro definitivo (homem), que alberga o verme adulto. Os

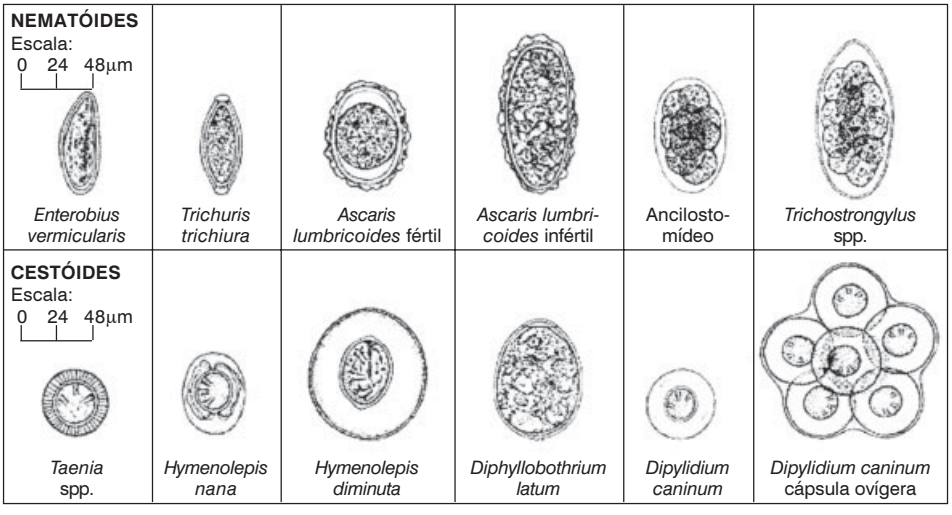


Fig. 38.4 — *Ovos de nematóides e de cestóides encontrados nos espécimes fecais humanos. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

ovos da *T. solium*, quando acidentalmente ingeridos pelo homem, podem desenvolver a larva *Cysticercus cellulosae*. As tênias apresentam um desenvolvimento obrigatoriamente intestinal[4,5,8,17] (Fig. 38.4).

Cestóides dos Tecidos

A ingestão de ovos de certos cestóides ou o contato acidental com a fase larvária e ovos podem levar o indivíduo a infecções com a *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* e outros cestóides[4,5,8].

TREMATÓDEOS

Os trematódeos adultos, parasitos do homem, vivem no intestino, no fígado, nos pulmões e nos vasos sangüíneos. O ciclo evolutivo dos trematódeos é complexo, envolvendo um hospedeiro definitivo (usualmente um vertebrado) e um intermediário (molusco). Os trematódeos são exclusivamente organismos parasitos, sendo hermafroditas, com exceção do gênero *Schistosoma*[4,5,7,17] (Fig. 38.5).

DIAGNÓSTICO DOS PROTOZOÁRIOS INTESTINAIS

A identificação de Protozoa requer que o parasitologista seja capaz de determinar se o organismo identificado é um protozoário e indicar com precisão se o protozoário diagnosticado é uma ameba ou um flagelado, e, finalmente, se o estágio encontrado é cisto ou trofozoíto. Em razão das variações morfológicas que ocorrem, vários organismos devem ser examinados antes da identificação final. Quando duas espécies diferentes são identifi-

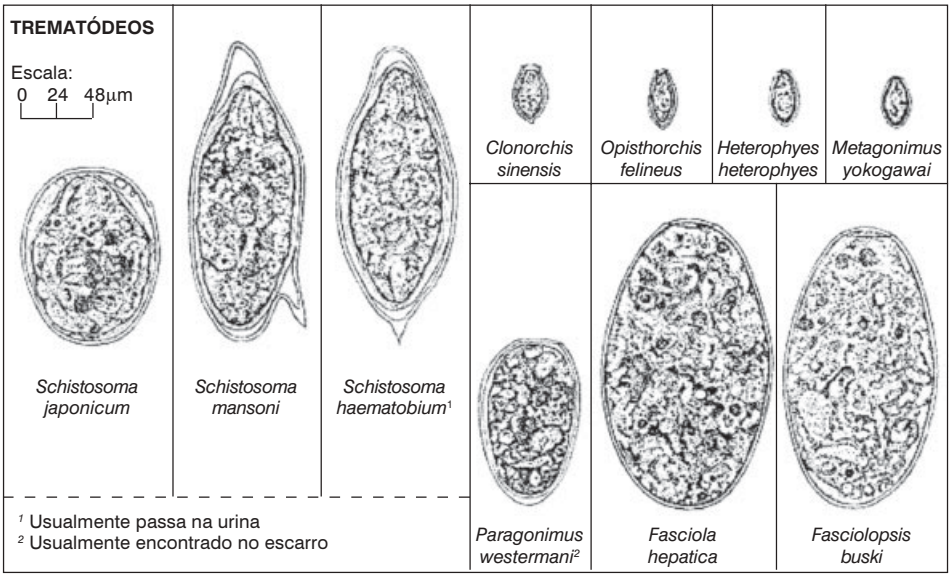


Fig. 38.5 — *Ovos de trematódeos encontrados nos espécimes fecais humanos. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

cadas, populações distintas de cada organismo podem ser observadas na mesma amostra fecal. Quando o paciente é portador de um parasito intestinal, uma pesquisa criteriosa deve ser realizada a fim de determinar se outras espécies estão presentes, desde que infecções mistas são bastante comuns. O material fecal varia quanto a sua consistência e geralmente é classificado em fezes formadas, semiformadas, pastosas ou líquidas (diarréicas). A Fig. 2.1 ilustra os estágios morfológicos dos protozoários intestinais, provavelmente como ocorrem em relação às várias categorias de consistência das fezes. Os trofozoítos são usualmente encontrados nas fezes líquidas, nas pastosas ou nas mucossanguinolentas, enquanto os cistos são diagnosticados nas fezes formadas ou semiformadas. As formas móveis de protozoários se degeneram mais rapidamente do que as formas císticas; por esta razão, é de extrema importância que o estudo dos espécimes fecais seja realizado o mais rápido possível. A diferenciação entre protozoários e artefatos é um dos maiores problemas para o microscopista. Os três principais grupos de elementos não-parasitos que podem ser confundidos com protozoários são: células do hospedeiro, artefatos fecais e microrganismos (Ver Capítulo 6). As amebas são diferenciadas dos flagelados tomando-se como base uma variedade de características. Os flagelados possuem forma regular, com um longo eixo e geralmente são visíveis algumas fibrilas no citoplasma. O núcleo dos trofozoítos flagelados geralmente mantém-se localizado próximo a uma das extremidades. No exame direto a fresco de esfregaços não corados, os flagelados movem-se através dos flagelos, os quais, com muita freqüência, não são visíveis nas preparações salinas ou pelas colorações permanentes de rotina; entretanto, esses organismos podem ser observados através da microscopia de campo escuro ou de contraste de fase. Os flagelos são mais facilmente observados nas preparações fixadas pela solução de formaldeído do que nas montagens salinas. As principais características morfológicas utilizadas na identificação dos protozoários intestinais são: **Tamanho**: baseado na medida do eixo mais longo do organismo. A morfometria deve ser realizada com micrômetro ocular. **Motilidade**: amebóide ou flagelar. **Núcleo**: a) número; b) presença ou ausência e distribuição da cromatina periférica; c) tamanho e localização do cariossoma; d) outras distribuições da cromatina periférica. **Citoplasma**: a) grosseiro ou finamente granuloso; b) vacúolos; c) presença de fibrilas; d) nos cistos — existência de glicogênio e corpos cromatóides; e) nos trofozoítos — material ingerido (bactérias, eritrócitos e leveduras)[4,12,13,16,19] (Fig. 38.6).

AMEBAS INTESTINAIS

A coloração geral das amebas intestinais observadas em material fecal corado pela hematoxilina férrica é de uma tonalidade acinzentada mais ou menos carregada; todas as estruturas dos protozoários contendo cromatina se coram em cinza negro ou mesmo em negro.

ENTAMOEBA

Caracteriza-se por ter um núcleo vesiculoso; presença de cromatina periférica sob a forma de grânulos maiores ou menores, revestindo a face

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte



Fig. 38.6 — *Desenhos de cistos de protozoários corados pela solução de iodo. A, B e C = Cistos uninucleados, binucleados e tetranucleados de* Entamoeba histolytica*; D e E = Cistos uninucleados e tetranucleados de* Entamoeba histolytica*; F = Cisto uninucleado de* Iodamoeba bütschlii*; G, H e I = Cistos uninucleados, binucleados e tetranucleados de* Endolimax nana*; J = Cistos uninucleados de* Chilomastix mesnili*; K, L, M e N = Cistos uninucleados, binucleados, tetranucleados e octanucleados de* Entamoeba coli*; O = Organismo* Blastocystis hominis*; P = Cisto tetranucleado de* Giardia lamblia*. (Reproduzido de Dobell C, O'Connor FW. The Intestinal Protozoa of Man. London: John Bale Sons & Danielsson, 1921.)*

interna da membrana nuclear; cariossoma relativamente pequeno, central ou excêntrico. Os cistos jovens apresentam glicogênio e corpos cromatóides em forma de massas ou bastonetes. Os corpos cromatóides coram-se em ne-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

gro pela hematoxilina, o glicogênio dissolve-se durante a coloração, deixando vacúolos maiores ou menores. Os cistos são em geral regulares, redondos ou ovais.

Endolimax

Caracteriza-se por possuir um núcleo vesiculoso, sem cromatina revestindo a face interna da membrana e um cariossoma relativamente grande e irregular de aparência variável nas diferentes espécies. Os cistos em geral são ovais com quatro núcleos, semelhantes aos das formas trofozoíticas; presença de escasso glicogênio; freqüentemente são vistos corpos cromatóides pequenos e ovais.

Iodamoeba

Caracteriza-se por ter um único núcleo vesiculoso, sem cromatina periférica; o cariossoma é grande e central. O cisto é irregular, possui um só núcleo e um grande e compacto vacúolo de glicogênio que, na coloração pela hematoxilina, se dissolve, deixando um vacúolo de paredes bem delimitadas, que toma a cor castanho-escura quando corado pela solução de iodo. Os cistos em geral apresentam-se de formas variadas: redondas, ovais e fusiformes. Os corpos cromatóides, em geral ausentes, são granulares quando presentes.

Nota: No exame de uma preparação a fresco ou corada devem ser observadas as seguintes características: **Trofozoíto**: a) diâmetro; b) motilidade; c) aparências do ectoplasma e do endoplasma; d) núcleo: cromatina periférica e cariossoma; e e) corpos de inclusão. **Cisto**: a) diâmetro; b) núcleo: cromatina periférica, cariossoma, número e arranjo; c) corpos cromatóides; e d) vacúolos de glicogênio[1,4,16].

Entamoeba histolytica

Trofozoítos

Os trofozoítos apresentam-se pleomórficos, ativos, assimétricos alongados e com emissão contínua e rápida de pseudópodes. Os trofozoítos vivos apresentam motilidade direcional e progressiva. O tamanho pode variar de 10-60μm; as formas não-invasivas usualmente medem 15-20μm e os organismos invasivos são maiores que 20μm. O núcleo é pouco visível nas formas vivas. Os trofozoítos quando corados (hematoxilina férrica) apresentam o citoplasma diferenciado em ectoplasma claro e hialino e endoplasma finamente granuloso com vacúolos, núcleos e restos de substâncias alimentares. A presença de hemácias no citoplasma é uma característica importante de diagnóstico da *E. histolytica*. O único núcleo (3-5μm em diâmetro) não é visível através do exame direto a fresco em preparações não coradas.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Nas colorações permanentes, o núcleo com localização central contém um cariossoma relativamente pequeno com cromatina periférica depositada na membrana nuclear. A morfologia nuclear é um dos critérios mais importantes utilizados na identificação. Os núcleos dos outros gêneros *Endolimax* e *Iodamoeba*, possuem cariossoma grande sem cromatina periférica na membrana nuclear (Fig. 38.7).

Cistos

Os cistos nas preparações coradas (solução de iodo) são geralmente esféricos, medindo 10-20μm (variação usual de 12-15μm) de diâmetro. Os cistos maduros apresentam quatro núcleos, enquanto os imaturos de um a dois, mas a sua morfologia é similar à encontrada nos trofozoítos. Os núcleos

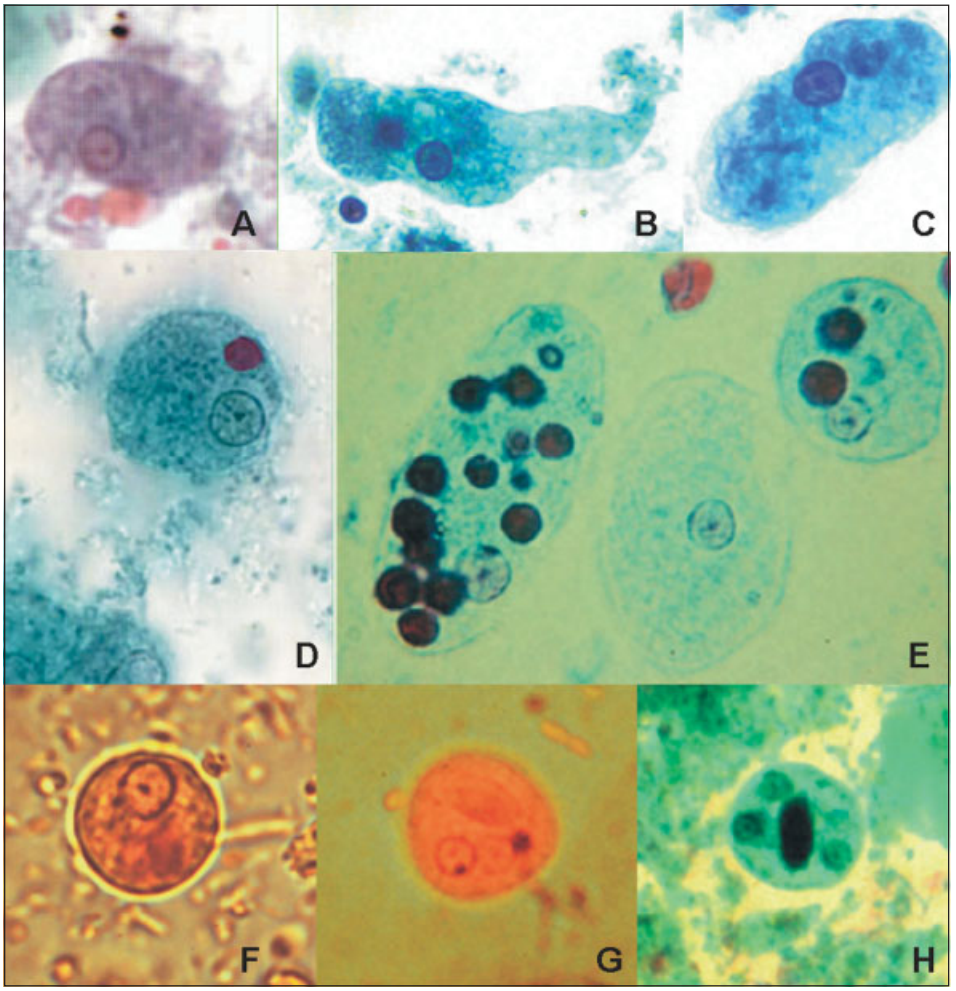


Fig. 38.7 — Entamoeba histolytica*: A, B e C = Trofozoítos corados pelo método do tricrômico; D e E = Trofozoítos corados pelo tricrômico. Duas características de diagnóstico são observadas nos dois estágios: eritrócitos ingeridos e núcleo tipicamente pequeno, com cariossoma central e cromatina periférica uniforme; F e G = Cistos corados pela solução de iodo; H = Cisto corado pelo tricrômico. Os cistos em G e H mostram corpos cromatóides. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

são dificilmente visíveis nas preparações a fresco. Os núcleos medem de 4 a 5,5µm e situam-se perto da margem do cisto, assim deslocados por um grande vacúolo. Esse vacúolo contém glicogênio, corado em castanho-avermelhado, constrastando nitidamente do citoplasma, que se cora em amarelo. O núcleo apresenta um pequeno cariossoma, usualmente central, mas ocasionalmente excêntrico, como um ponto negro medindo cerca de 0,5µm. A membrana nuclear é revestida de grânulos de cromatina regulares. No citoplasma podem estar presentes corpos cromatóides usualmente alongados, com forma de charutos ou bastonetes com as pontas arredondadas ou ovais. As diferentes inclusões, tais como corpos cromatóides e/ou glicogênio, podem ser utilizadas para a identificação dos organismos. Por divisão binária, o cisto uninucleado torna-se binucleado e, finalmente, quadrinucleado (Fig. 38.7).

ENTAMOEBA COLI

Trofozoítos

Apesar do tamanho variar de 15-50µm, os trofozoítos dessa espécie usualmente medem de 20-25µm. Os trofozoítos vivos são lentos, com motilidade raramente progressiva e direcional. Os pseudópodes são lentamente emitidos, são mais curtos e mais rombos e granulosos. Um único núcleo é freqüentemente visível nas preparações não-coradas, com cromatina grosseira e irregular e o cariossoma grande e irregular. No citoplasma usualmente são observadas bactérias e detritos e ausência de hemácias. Nas preparações coradas (hematoxilina férrica), o organismo apresenta núcleo grande, cariossoma não-compacto, com localização excêntrica, cromatina grosseira e irregular no tamanho e distribuição na membrana nuclear. O citoplasma não é diferenciado em endo e ectoplasma, apresenta vacúolos e pode conter bactérias e outros materiais (Fig. 38.8).

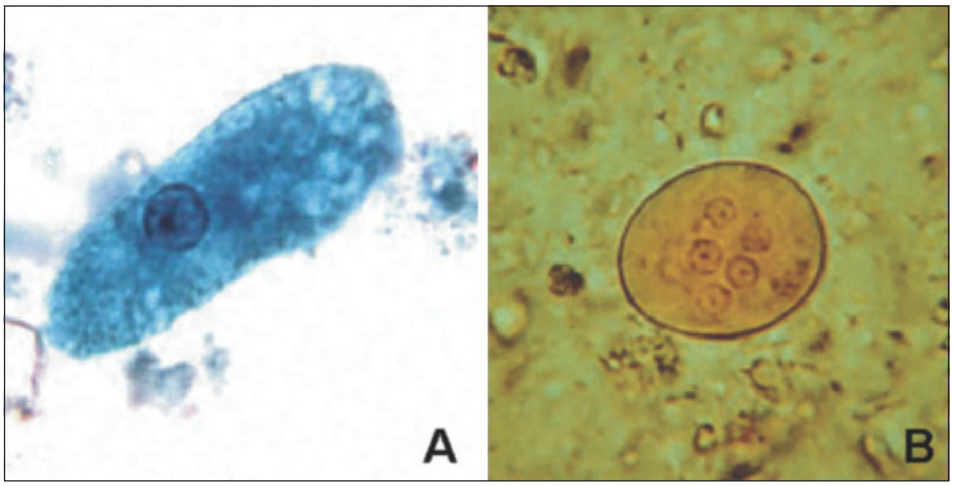


Fig. 38.8 — Entamoeba coli*: A = Trofozoíto corado pelo tricrômico, mostrando cariossoma grande e excêntrico e o citoplasma com vacúolos; B = Cisto corado pela solução de iodo, mostrando seis núcleos. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Cistos

Os cistos da *E. coli* nas preparações coradas (solução de iodo) são geralmente esféricos, medindo 10-35μm (variação usual de 15-25μm), contendo até oito núcleos. Quando corados, a membrana mostra-se grosseira, com grânulos cromáticos irregulares dispostos sobre ela. Os corpos cromatóides são filamentosos, terminando em duas ou mais pontas finas, semelhantes a "feixes de agulhas"; enquanto os da *E. histolytica* são bastonetiformes, com as extremidades rombas. Os corpos cromatóides da *E. coli* desaparecem dos cistos muito rapidamente (Fig. 38.8).

Entamoeba hartmanni

Trofozoítos

Esse estágio mede de 5-12μm, com um tamanho médio de 8-10μm. Geralmente, o movimento dos trofozoítos vivos é ativo (não progressivo). Os trofozoítos, como os cistos, são pequenos e delicados. O único núcleo (5-8μm) não é visto nas preparações não coradas. Quando corado (hematoxilina férrica), o organismo mostra um núcleo compacto, central ou excêntrico. A cromatina periférica apresenta-se na forma de delicados grânulos separados, uniformes no tamanho e na distribuição em forma crescente. O citoplasma é granular e pode conter bactérias, mas apresenta hemácias (Fig. 38.9).

Cistos

Os cistos maduros têm quatro núcleos, com forma esférica, medindo de 5-10μm com uma variação usual de 6-8μm. Os núcleos não são visíveis nas preparações não coradas, mas visíveis quando corados pela solução de iodo. Os cistos imaturos com um a dois núcleos são encontrados com mais freqüência do que os organismos com quatro núcleos. Nas preparações coradas, o núcleo usualmente tem um pequeno e discreto cariossoma central; a cromatina periférica é igualmente distribuída, como delicados e uniformes grânulos. Como na *E. histolytica*, o glicogênio é difuso e discreto nos cistos imaturos. Os corpos cromatóides têm as extremidades quadradas.

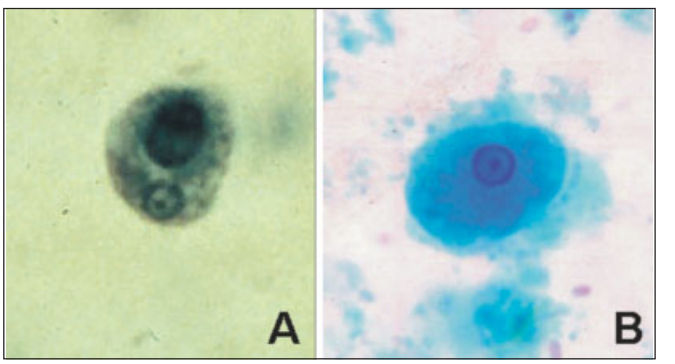


Fig. 38.9 — Entamoeba hartmanni*: A e B = Trofozoítos corados pelo tricrômico. A = O trofozoíto ingeriu um fungo. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Endolimax nana

Trofozoítos

É a menor ameba que vive no homem, medindo de 6-12μm, com uma variação usual de 8-10μm. Os trofozoítos vivos são lentos e geralmente não progressivos, com citoplasma claro, membrana nuclear fina e sem grãos de cromatina, cariossoma grande e irregular. Nas preparações coradas (hematoxilina férrica), o cariossoma é grande, central ou excêntrico. Ausência de cromatina periférica na membrana nuclear. O citoplasma é grosseiro, freqüentemente com muitos vacúolos, podendo conter várias bactérias (Fig. 38.10).

Cistos

O cisto é oval, mede de 5-10μm (com uma variação usual de 6-8μm), com o citoplasma claro, membrana nuclear fina e sem grãos de cromatina, cariossoma grande e irregular. Contém quatro núcleos pequenos; às vezes podem ser vistos corpos cromatóides pequenos e ovóides (Fig. 38.10).

Iodamoeba bütschlii

Trofozoítos

Esse estágio mede de 8-20μm, com uma variação usual de 12-15μm. Os trofozoítos vivos são lentos com movimentos não progressivos. Quando corado (hematoxilina férrica), mostra um núcleo grande e central, com um grande cariossoma no centro do núcleo ou levemente excêntrico. Não apresenta cromatina periférica. O citoplasma é grosseiro, com muitos vacúolos, podendo conter várias bactérias. Sinonímia: *Iodamoeba beutschlii* (Fig. 38.11).

Cistos

É uma ameba comum e pequena, medindo de 5-20μm com forma esférica (com uma variação usual de 10-12μm). O núcleo tem membrana espessa e não apresenta cromatina periférica; o cariossoma é grande e cen-

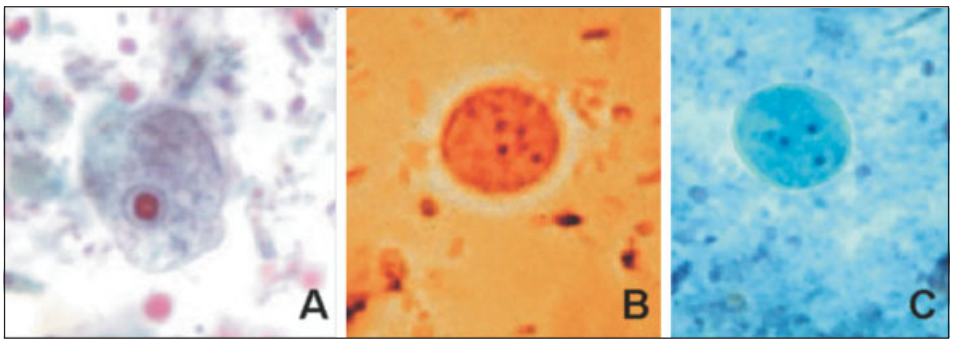


Fig. 38.10 — Endolimax nana*: A = Trofozoíto corado pelo tricrômico; B = Cisto corado pela solução de iodo; C = Cisto corado pelo tricrômico. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

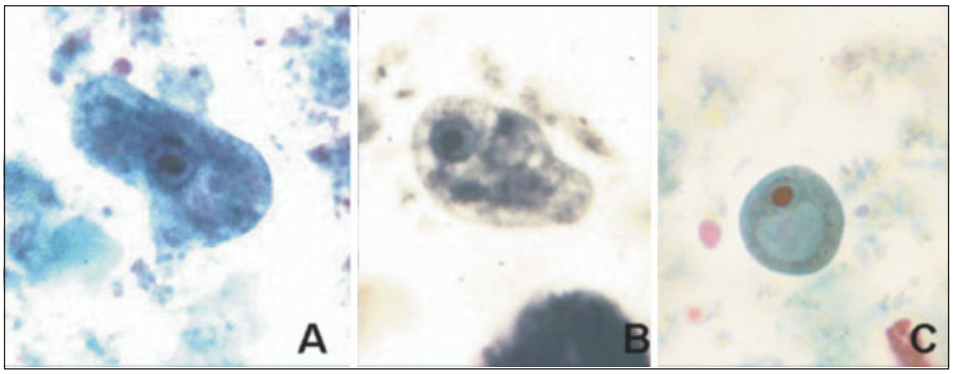


Fig. 38.11 — Iodamoeba bütschlii*: A e B = Trofozoítos corados pelo tricrômico; C = Cisto corado pelo tricrômico. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

tral. O cisto possui um só núcleo e um grande vacúolo de glicogênio, que, quando corado pela solução de iodo, toma a cor castanho-escuro. O vacúolo de glicogênio não se cora pelas colorações permanentes, mas aparece como uma estrutura muito bem definida (Fig. 38.11).

Blastocystis hominis

Estágio Tipo Cisto

O *B. hominis* apresenta três formas morfológicas: vacuolar, granular e amebóide. A forma vacuolar (ou vacuolada) é esférica, medindo de 4-15µm de diâmetro, sendo caracterizada por um grande vacúolo central, o qual é também chamado de corpo central. O organismo apresenta uma fina borda de citoplasma com muitos grânulos. Uma fina e delicada cápsula é vista rodeando o organismo nesta fase. A forma granular mede de 10-60µm de diâmetro. Essa estrutura é predominante nas culturas, mas também é observada nas fezes. A grande diferença entre a forma granular e a vacuolar é a grande presença de pequenos grânulos na área vacuolar. A forma amebóide é irregular, medindo de 2,6-7,8µm de diâmetro, com um ou dois pseudópodes, um ou dois núcleos e, usualmente, não contém o vacúolo central. Bactérias ingeridas pelo organismo podem ser vistas nos corpos tipo lisossomo dentro do citoplasma. A forma amebóide pode se transformar na forma vacuolar e vice-versa. O *B. hominis* modifica a sua forma pela emissão e retração de pseudópodes. Estudos recentes mostraram que a predominância nas fezes não é a forma vacuolar, mas pequenas estruturas, incluindo as formas multivasculares (5-8µm) e formas avacuoladas (5µm) (Fig. 38.12).

FLAGELADOS INTESTINAIS

Chilomastix mesnili

Trofozoítos

Os trofozoítos medem de 6-24µm de comprimento com uma variação usual de 10-15µm e 4-8µm de largura. Os trofozoítos vivos têm a forma piriforme

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

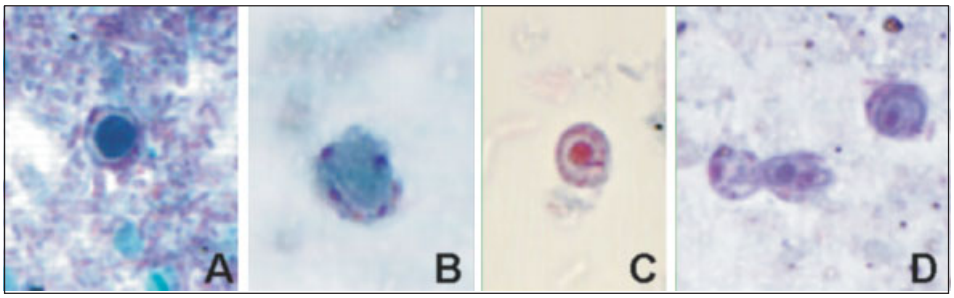


Fig. 38.12 — Blastocystis hominis. *A-D = Organismos corados pelo tricrômico. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA)*

irregular, sendo a extremidade posterior mais afilada e a anterior mais achatada. Os organismos vivos têm movimentos rotatórios desajeitados. O único núcleo não é visível nas preparações a fresco. A presença de um sulco espiralado estende-se diagonalmente ao longo do corpo. O núcleo localiza-se na porção anterior ou porção larga do corpo. A membrana nuclear é preta e bem definida. O cariossoma é pequeno, redondo, situado para um lado do núcleo. Os pequenos grânulos de cromatina periférica são de forma granular, que podem ser vistos eventualmente ou distribuídos irregularmente na membrana nuclear.

Cistos

Os cistos são piriformes, ovais ou arredondados, com aspecto característico de limão. Os organismos medem cerca de 6-10μm de comprimento (com uma variação usual de 7-9μm) e 4-6μm de largura. Corados pela solução de Lugol tomam uma coloração azeitonada (pardo-esverdinhada). A cromatina periférica pode estar concentrada em um dos lados do núcleo. O citóstoma invaginado e o núcleo se apresentam bem visíveis no cisto.

Giardia lamblia

Trofozoítos

Os trofozoítos são organismos piriformes, medindo de 10-20μm, de comprimento (com uma variação usual de 12-15μm) por 5-15μm de largura. Os trofozoítos são dotados de estruturas celulares duplas na fase vegetativa (dois núcleos, dois axonemas e oito flagelos), com simetria bilateral. Quando corados pela hematoxilina férrica o citoplasma é alveolar e granular, de coloração cinzenta-azulada; os núcleos e outras estruturas, de coloração negra. Os trofozoítos são convexos, dorsalmente, e côncavos, ventralmente. Na superfície ventral há uma concavidade ovóide, o disco adesivo (disco ventral ou suctorial), que pode ocupar 3/4 do mesmo, sendo observada, ainda, na parte ventral, a presença de uma ou duas estruturas paralelas, em forma de vírgula, conhecidas como corpos medianos. Os organismos corados mostram dois núcleos redondos ou ovóides, um de cada lado da linha mediana, com grande cariossoma redondo, central ou lateralizado, sem cromatina periférica. Esse protozoário possui oito flagelos, quatro dos quais são laterais, dois centrais e dois caudais. Cada flagelo nasce de um cinetoplasto. Nos trofozoítos vivos são visíveis os

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

movimentos dos flagelos; entretanto, os flagelos não são vistos nas preparações coradas a não ser quando são usadas colorações específicas (Fig. 38.13).

Cistos

Os cistos são ovais ou elipsóides, medindo cerca de 8-19μm de comprimento (com uma variação usual de 11-14μm) e 7-10μm de largura. Os cistos, quando corados, podem mostrar uma delicada membrana destacada do citoplasma. No seu interior encontram-se dois ou quatro núcleos, um número variável de fibrilas (axonemas de flagelos) e os corpos escuros em forma de meia-lua e situados no pólo oposto aos núcleos. Os cistos, quando corados pela solução de iodo, apresentam uma tonalidade pardacenta, mais ou menos carregada; às vezes, exibem coloração pardo-esverdeada (azeitona); os axonemas, os corpos parabasais coram-se em negro. Os cistos podem apresentar a forma arredondada (Fig. 38.13).

Nota: Sinonímia — *Giardia duodenalis*, *Giardia intestinalis* e *Lamblia intestinalis*.

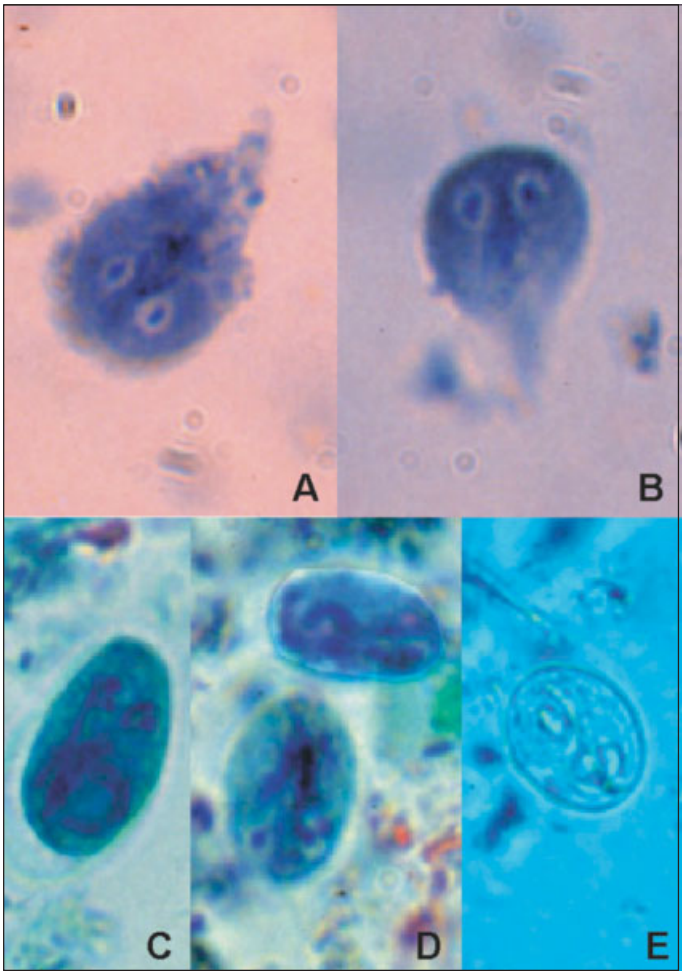


Fig. 38.13 — Giardia lamblia. *A e B = Trofozoítos corados pela hematoxilina férrica; C e D = Cistos corados pela hematoxilina férrica; E = Cisto – exame direto a fresco. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Enteromonas hominis

Trofozoítos

Os trofozoítos medem cerca de 4-10μm de comprimento (com uma variação usual de 8-9μm) por 5-6μm de largura. Os organismos vivos têm a forma oval, podendo o corpo tomar a forma de pêra, achatada em um dos lados. Possuem três flagelos anteriores e um que corre ao longo da margem achatada do organismo e se torna livre na extremidade posterior. Não possui citóstoma e o núcleo situa-se anteriormente.

Cistos

Os cistos são ovais, medindo 4-10μm de comprimento (com uma variação usual de 6-8μm) por 4-6μm de largura, apresentando um a quatro núcleos, dispostos, nas formas multinucleadas, nos pólos opostos da célula. Assemelham-se aos cistos da *Endolimax nana*. Usualmente não são vistos fibrilas ou flagelos.

Retortamonas intestinalis

Trofozoítos

Os trofozoítos são ovais ou piriformes, medindo 4-9μm de comprimento (com uma variação usual de 6-7μm) por 3-4μm de largura. Possuem dois flagelos: um anterior, do mesmo comprimento do corpo, e outro posterior, mais curto. O núcleo é esférico, localizado na porção anterior, com um cariossoma central que possui uma fina camada de cromatina periférica.

Cistos

Os cistos são piriformes, medindo 4-9μm de comprimento (média 4-7μm) por 5μm de largura. Assemelham-se aos cistos do *Chilomastix mesnili*.

Dientamoeba fragilis

Trofozoítos

Esse estágio mede de 5-15μm em média (com uma variação usual de 10-12μm). A motilidade é ativa e progressiva. A maioria dos organismos possui dois núcleos, apesar de aproximadamente 30% a 40% dos organismos não terem núcleo. Os núcleos são invisíveis nas preparações não coradas. Os organismos corados pela hematoxilina férrica apresentam um cariossoma central, grande e composto por quatro a oito grânulos e ausência de cromatina periférica na membrana nuclear. O citoplasma pode variar de delicado a grosseiro, apresentando muitos vacúolos e muitas bactérias. Ausência de hemácias. Esta espécie não possui a forma cística (Fig. 38.14).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

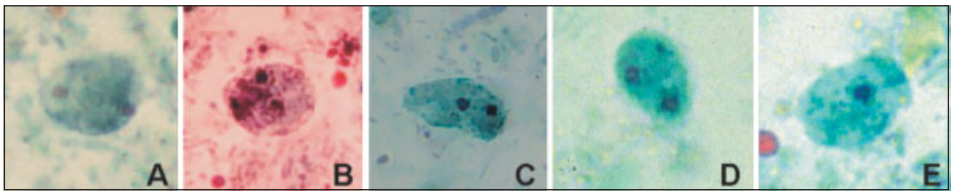


Fig. 38.14 — Dientamoeba fragilis. *A, B, C, D e E = Trofozoítos corados pelo tricrômico. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

CILIADOS INTESTINAIS

BALANTIDIUM COLI

Trofozoítos

O trofozoíto do *B. coli* é o maior protozoário parasito do homem. Os organismos medem de 50-100 x 40-70μm. A forma é oval e a extremidade anterior é mais afilada do que a posterior; o corpo é uniformemente coberto por cílios. Na região oral há fileira de cílios mais longos. Anteriormente, encontra-se uma fenda em forma de funil (citóstoma), e posteriormente a abertura anal (citopígio). O parasito apresenta no endoplasma dois vacúolos contráteis e dois núcleos. O macronúcleo tem forma de rim, situa-se no meio do corpo. O micronúcleo, pequeno e esférico, encontra-se numa depressão do macronúcleo (Fig. 38.15).

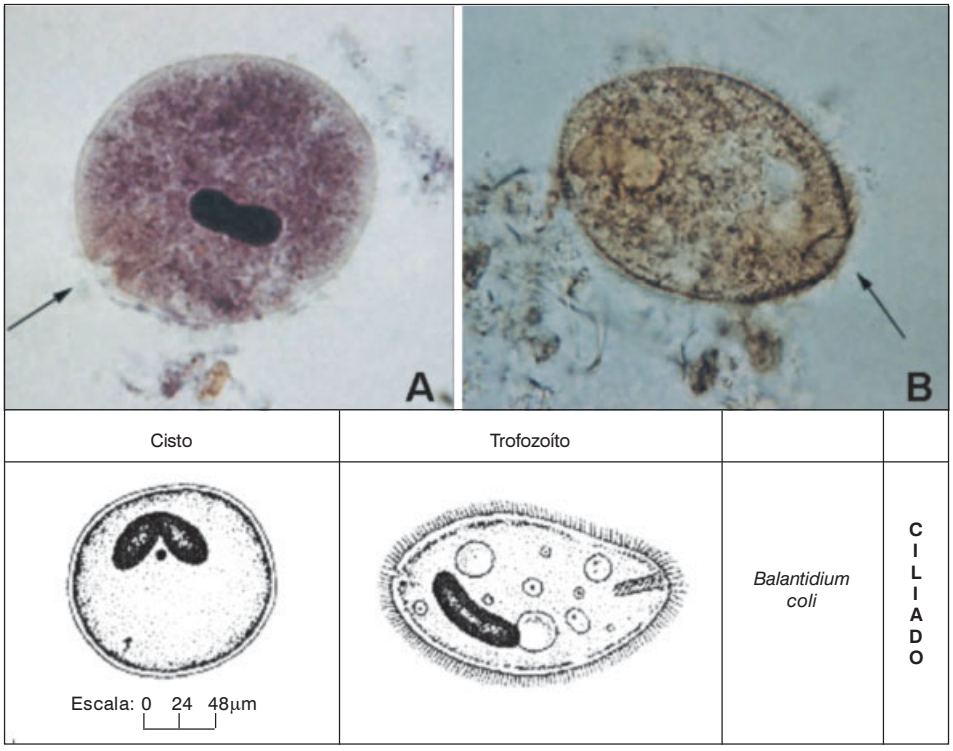


Fig. 38.15 — Balantidium coli. *A e B = Trofozoítos encontrados nos espécimes fecais humanos. A seta indica o citóstoma. Desenhos do estágio de cisto e do estágio de trofozoíto (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Cistos

Os cistos são ovais ou esféricos, medindo usualmente de 50-70μm. Os cílios são freqüentemente visíveis na fina parede cística. A multiplicação nuclear não ocorre no estágio de cisto, por essa razão estão presentes o grande macronúcleo e o pequeno micronúcleo. As inclusões citoplasmáticas não são expulsas durante o encistamento, conseqüentemente os vacúolos contráteis e digestivos podem ser vistos nos cistos jovens (Fig. 38.15).

COCCÍDIOS INTESTINAIS

Cryptosporidium parvum

Oocistos

Os oocistos, pelo exame direto a fresco, apresentam-se como uma estrutura geralmente esférica de 3-6μm de diâmetro (média 4-5μm) (Tabelas 10.1 e 10.2), com membrana externa fina e citoplasma finamente granulado. A mancha negra proeminente, central ou lateral, representa os corpos residuais. Os quatro esporozoítos livres aparecem como pequenas manchas dispostas na periferia em forma de "C". O núcleo é visto no centro do organismo. Nos esfregaços permanentes corados os oocistos aparecem arredondados com 3-5μm, de coloração do rosa ao vermelho, ao púrpura intenso, com uma zona clara entre os esporozoítos corados e a parede do oocisto. Alguns dos quatro esporozoítos podem ser vistos. O fundo da preparação é corado em azul ou verde, quando corados pelos derivados de Ziehl-Neelsen. A parede é espessa e o citoplasma é finamente granulado com uma zona central clara. Os corpos residuais e os esporozoítos são corados em castanho. As leveduras e as bactérias aparecem uniformemente coradas em azul ou verde. Os organismos presentes freqüentemente apresentam, entre eles, uma intensidade de cor variável. O *C. parvum* difere dos outros coccídios em relação ao desenvolvimento de seus estágios, que ocorrem intracelularmente com localização extracitoplasmática nas células dos hospedeiros (Fig. 38.16).

Cyclospora cayetanensis

Oocistos

Os oocistos, pelo exame direto a fresco, não são esporulados quando excretados nas fezes; eles necessitam de uma a duas semanas em condições ideais de temperatura para se tornarem esporulados. Os oocistos esporulados são arredondados, com 8-9μm de diâmetro (variando de 7,7-10μm). Cada oocisto esporulado possui dois esporocistos ovais (4 x 6,3μm) e cada esporocisto apresenta dois esporozoítos (1,2 x 9μm). Os oocistos possuem uma evidente e bem definida parede cística. Os oocistos mostram internamente agrupamentos de glóbulos refráteis, rodeados por uma membrana espessa. Esses glóbulos internos coram-se de castanho pela solução

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

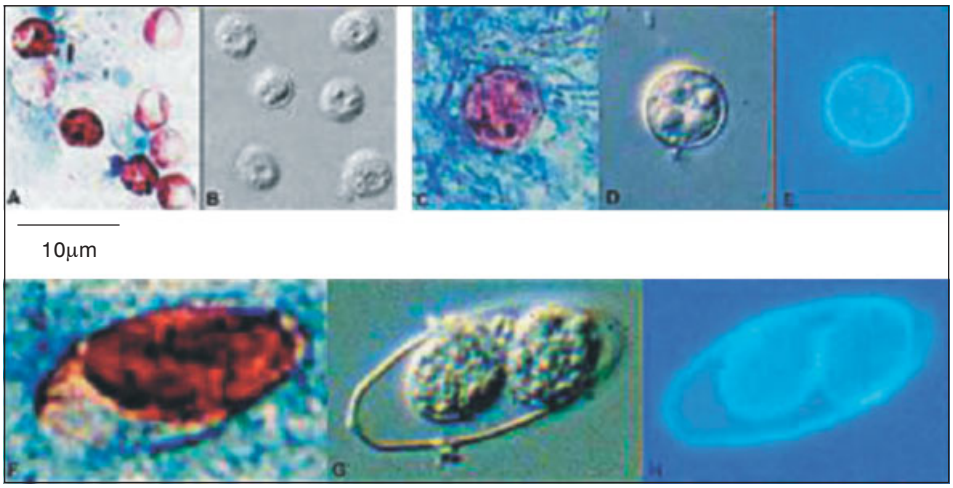


Fig. 38.16 — *A e B* = Cryptosporidium parvum*; C, D e E* = Cyclospora cayetanensis*; F, G e H* = Isospora belli. *(Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.) (Descrição: ver Fig. 10.7, p. 257).*

de iodo. Os oocistos da *Cyclospora* são duas vezes maiores em tamanho do que os estágios de diagnóstico do *C. parvum* (arredondados, esféricos ou ovais, com 4-5µm de diâmetro) e um terço menores do que a *I. belli* (elipsóides, 20-30 x 10-19µm). A morfometria com o micrômetro ocular é indispensável para a identificação das espécies. Nos esfregaços permanentes corados, curiosa e inexplicavelmente, a *Cyclospora* exibe marcada variabilidade de coloração quando corada pelos derivados de Ziehl-Neelsen. Os oocistos coram-se do rosa ao vermelho, ao púrpura intenso, sobre um fundo azul ou verde de intensidade de cor variável. Entretanto, os oocistos não apresentam morfologia interna bem definida, mostrando intensidade de cor variável. Essa variabilidade de coloração deixa de ser um problema nas infecções maciças, porque sempre serão observados vários oocistos corados. Foram relatados casos em que todos os oocistos presentes no esfregaço fecal não foram corados. Os oocistos em preparações coradas pelos derivados de Ziehl-Neelsen são uniformes no tamanho, permanecendo com a mesma grandeza como foram descritos no exame direto a fresco. Entretanto, com mais freqüência do que nas preparações a fresco, os oocistos não são perfeitamente arredondados. A parede dos oocistos apresenta uma típica aparência rugosa ou ondulada e colapso ou distorção em um ou em vários lados. Dependendo do grau de coloração, os oocistos podem variar em cor, desde organismos incolores ou de coloração vermelha clara, a um intenso e brilhante púrpura avermelhado. Essa variabilidade na intensidade de coloração, apesar de ser uma das características da *Cyclospora*, tem indubitavelmente levado a muitos erros no diagnóstico de laboratório (Fig. 38.16).

ISOSPORA BELLI

Oocistos

Quando excretados nas fezes, os oocistos são imaturos (não esporulados), contendo um esporoblasto. Depois da excreção os oocistos maduros divi-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

dem-se formando dois esporoblastos. Os esporoblastos segregam cada qual uma membrana resistente em torno de si, transformando-se em esporocistos, com quatro esporozoítos dentro de cada um. Os oocistos da *I. belli* medem de 20-30μm de comprimento, em média, e de 10-19μm de largura, com as extremidades afuniladas (regiões polares). Em preparações fixadas e coradas, o oocisto é tipicamente elipsóide, apresentando uma dupla parede lisa e hialina. Quando corado pelos derivados de Ziehl-Neelsen, a *I. belli* apresenta coloração do rosa ao vermelho, ao púrpura intenso. Os oocistos imaturos aparecem corados, enquanto os oocistos maduros mostram os dois esporocistos corados, usualmente do rosa ao púrpura, com uma zona clara entre os esporocistos corados e a parede do oocisto. O fundo da preparação é corado em azul ou verde (Figs. 38.16 e 38.17).

TRICHOMONAS spp.

TRICHOMONAS VAGINALIS

Trofozoítos

O tricomonas é uma célula polimorfa, tanto no hospedeiro natural como em meios de cultura. Os espécimes vivos são elipsóides ou ovais e algumas vezes esféricos. O protozoário é muito plástico, tendo a capacidade de formar pseudópodes, que são usados para capturar os alimentos e se fixar em partículas sólidas, mas não para a realização de movimentos amebóides. Em preparações fixadas e coradas, ele é tipicamente elipsóide, piriforme ou oval, medindo 9,7μm de comprimento, em média, (variando entre 4,5 e 19μm) e 7μm de largura (variando entre 2,5 e 12,5μm) (Tabela 38.1). Os organismos vivos são um terço maiores. Como todos os tricomonadídeos, não possui a forma cística, somente a trofozoítica. A forma é variável, tanto nas preparações a fresco como nas coradas (Fig. 38.18).



Fig. 38.17 — Isospora belli. *A e B = Oocistos imaturos, não esporulados, contendo um esporoblasto após a excreção; C = Oocisto com dois esporocistos e quatro esporozoítos dentro de cada um. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

TRICHOMONAS HOMINIS

Trofozoítos

O corpo é piriforme, medindo 8-20 x 3-14μm (Tabela 38.1). Essa espécie possui cinco flagelos anteriores, em um arranjo "4+1", mas alguns organismos podem apresentar quatro flagelos e outros, três. Os quatro flagelos anteriores estão agrupados entre si; o quinto está separado e direcionado para a extremidade posterior. O sexto flagelo ocorre ao longo da membrana ondulante, estendendo-se sobre ela como um flagelo livre. A membrana ondulante corre ao longo de toda a célula. Estão presentes nesse organismo o filamento acessório, a costa, o blefaroplasto e a pelta. O núcleo é arredondado. Sinonímia: *Pentatrichomonas hominis* (Fig. 38.18).

TRICHOMONAS TENAX

Trofozoítos

O trofozoíto é elipsóide, ovóide ou piriforme, medindo 4-16 x 2-15μm (Tabela 38.1). A estrutura deste parasito é semelhante ao *T. vaginalis*, apresentando quatro flagelos anteriores. O *T. tenax* não sobrevive no estômago e não pode ser estabelecido na vagina. O organismo é um protozoário flagelado comensal, com ampla distribuição geográfica, habitando a cavidade bucal do homem (Fig. 38.18).

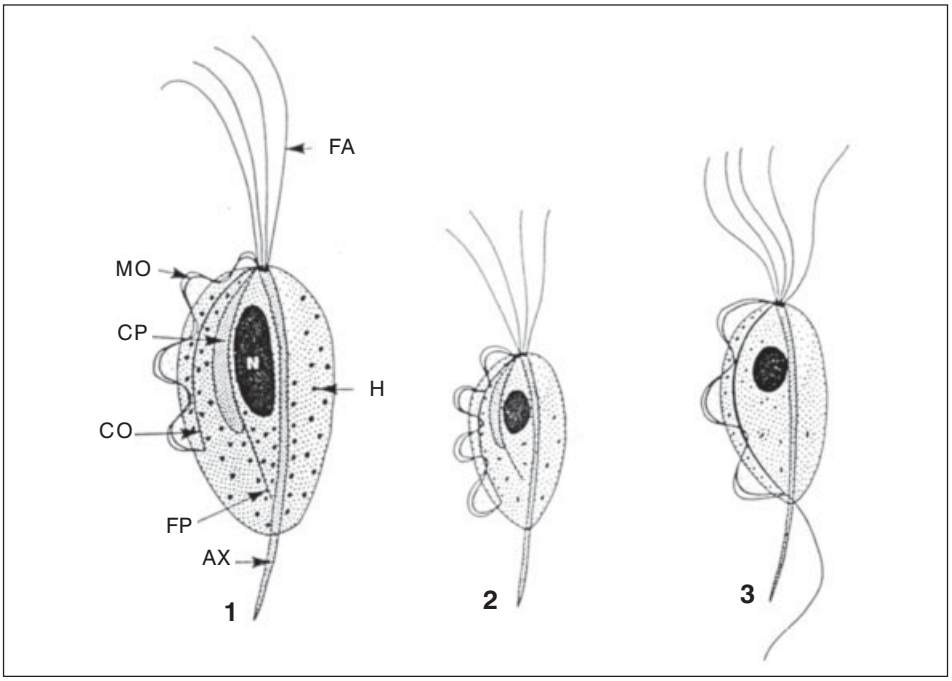


Fig. 38.18 — Trichomonas *humanos. 1* = Trichomonas vaginalis*; 2* = Trichomonas tenax*; 3* = Trichomonas hominis*; FA = Flagelo anterior livre; MO = Membrana ondulante; CP = Corpo parabasal e aparato de Golgi (são vistos juntos); N = Núcleo; H = Hidrogenossomos; CO = Costa; AX = Axóstilo; FP = Filamento parabasal. (Adaptada de Mehlhorn H. editor. Parasitology in focus. Berlin: Springer-Verlag; 1988.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Tabela 38.1
Características Diferenciais de Diagnóstico entre os *Trichomonas* de Importância na Medicina Humana[3,4]

Estruturas	*Trichomonas vaginalis*	*Trichomonas hominis*	*Trichomonas tenax*
Tamanho (μm)	4,5-19 x 2,5-12,5	8-20 x 3-14	4-16 x 2-15
Forma	Piriforme, ovóide ou elipsóide	Piriforme, ovóide ou elipsóide	Piriforme
Flagelos anteriores	4	3-5 (4+1)	4
Membrana ondulante	1/2 da célula	Em toda a célula	1/2 da célula
Axóstilo	Presente	Presente	Presente
Núcleo (extremidade anterior)	Oval	Oval	Oval

DIAGNÓSTICO DOS PROTOZOÁRIOS DO SANGUE E DOS TECIDOS

TOXOPLASMA GONDII

Trofozoítos

Em esfregaços corados, esses organismos em forma de crescente (forma grosseira de "banana" ou "meia-lua"), arredondados numa das extremidades e afilados na outra, com núcleo (com aspecto granular) em posição mais ou menos central e situado mais perto da extremidade arredondada, medem aproximadamente 4-8μm de comprimento e 2-3μm de largura. Corados pelo método de Giemsa apresentam citoplasma azulado e núcleo vermelho. Nos esfregaços são encontrados fora das células, devido à ruptura destas. Parasitam muitas células do organismo, em especial as do sistema fagocítico mononuclear (SFM). Os trofozoítos são também designados como taquizoítos ou formas proliferativas[3,4,15] (Fig. 38.19).

TRYPANOSOMA CRUZI

Tripomastigota

As formas tripomastigotas com aproximadamente 20μm (variando de 15-28μm) de comprimento são os estágios infectantes do parasito. Caracterizam-se por serem fusiformes e alongadas, com extremidade afilada, núcleo central, cinetoplasto grande e de localização terminal ou subterminal e um flagelo que parte da bolsa flagelar situada entre o núcleo e a parte posterior da célula. O flagelo mantém-se aderido ao corpo celular através de uma membrana ondulante pouco pregueada e a extremidade livre mede cerca de um terço do comprimento do parasito. As formas tripomastigotas coradas pelo método de Giemsa apresentam o citoplasma azul-claro, núcleo vermelho-púrpura e o cinetoplasto azulado-purpúreo. (Descrição: M Steindel, EC Grisard.)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

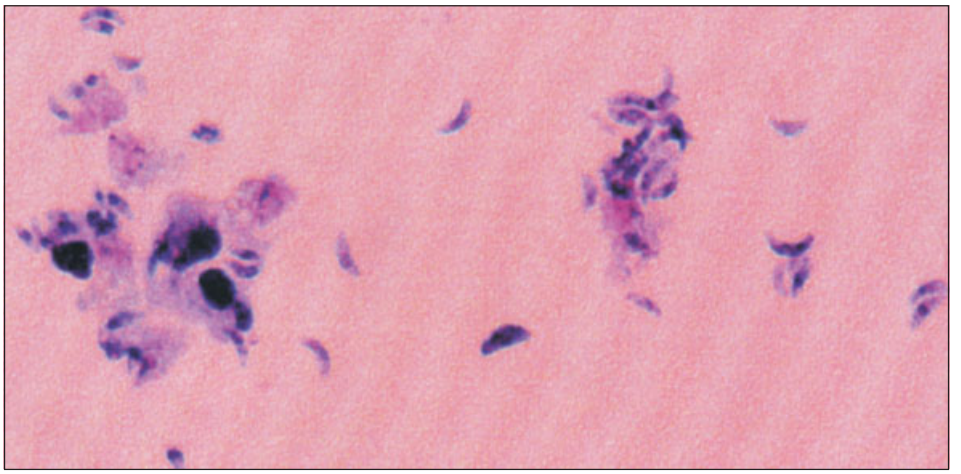


Fig. 38.19 — Toxoplasma gondii *colhido de lavado broncoalveolar (LBA) de paciente infectado com HIV. Numerosos trofozoítos (taquizoítos) na forma de crescente com núcleos proeminentes. A maioria dos taquizoítos estão livres, mas alguns estão associados com células broncopulmonares. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

Epimastigota

As formas epimastigotas são formas multiplicativas do parasito no intestino do triatomíneo e em meio de cultura. Morfologicamente, as células são alongadas e variáveis no comprimento (15 a 35μm), podendo ser encontradas isoladas ou agrupadas. Coradas pelo Giemsa, as células apresentam o citoplasma azul-claro, podendo ser observados vacúolos. O núcleo é arredondado e localiza-se na região mediana e o cinetoplasto, em forma de bastonete, localiza-se anteriormente próximo ao núcleo, ambos corados em vermelho-púrpura. A membrana ondulante é pouco perceptível e o flagelo livre mede cerca de 12μm. (Descrição: M Steindel, EC Grisard.)

Amastigota

As formas amastigotas de *T. cruzi* caracterizam-se pelas pequenas dimensões do corpo celular cerca de 4μm, formato esférico ou ovóide, presença de um núcleo grande e cinetoplasto em forma de bastão. Não apresentam motilidade, carecem de flagelo livre e constituem os estágios de multiplicação intracelular no hospedeiro mamífero. (Descrição: M Steindel, EC Grisard.)

Leishmania

Amastigota

As formas amastigotas são organismos esféricos ou ovóides com tamanho de 4 a 6μm presentes no interior de macrófagos. Na coloração pelo Giemsa, o citoplasma é azul-claro, o núcleo grande é arredondado, e o cinetoplasto caracteriza-se pela forma de bastão, ambos corados em vermelho-púrpura. Não há flagelo livre, e por vezes podem ser visualizados pequenos vacúolos citoplasmáticos. (Descrição: M Steindel, EC Grisard.)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Promastigota

As formas promastigotas são alongadas, com um flagelo emergindo do corpo do parasito na sua porção anterior. O núcleo é arredondado ou oval e está situado na região mediana ou ligeiramente anterior do corpo. O cinetoplasto, em forma de bastão, localiza-se na porção mediana entre o núcleo e a região anterior da célula. As dimensões das formas variam de 10 a 40μm de comprimento a 1,5 a 3,0μm de largura, podendo ser muito variável dentro de uma espécie tanto em cultura quanto no intestino do vetor. O flagelo livre freqüentemente é maior que o corpo. (Descrição: M Steindel, EC Grisard.)

CRITÉRIOS PARA A DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *PLASMODIUM*

Dois tipos de esfregaços são preparados para o diagnóstico laboratorial da malária: os espessos e os estirados. Entretanto, a combinação de ambos em uma mesma lâmina de microscopia pode oferecer melhores resultados. Uma variedade de corantes e métodos de coloração é indicada para corar e identificar os parasitos. Entretanto, as características morfológicas são melhor observadas nos esfregaços corados pelo método de Giemsa a 5% em tampão de fosfatos pH 7,2 (ver capítulos 12 e 15).

Esfregaços Estirados

Os esfregaços estirados são preparações sangüíneas que usam pequena quantidade de sangue; entretanto, esses esfregaços não apresentam bons resultados quando a densidade dos parasitos da malária é baixa.

Esfregaço Espesso

Os esfregaços espessos são preparações sangüíneas que usam quantidades relativamente grandes de sangue em pequena área, a qual é dese-moglobinizada para oferecer melhores resultados ao exame microscópico (ver Capítulo 15). Três importantes componentes dos parasitos da malária devem ser vistos nos esfregaços corados pelo método de Giemsa: citoplasma corado em azul-escuro; cromatina (núcleo) em rosa malva viva (vermelho ao púrpura) e pigmentos, os quais não se coram, mas variam, dependendo da espécie, do marrom-amarelado ao preto. Exceto nas formas parasitárias mais jovens, todos os três componentes deverão ser observados, como regra, para identificar uma estrutura como um parasito da malária. A descrição das características morfológicas das formas das diferentes espécies causadoras da malária humana foram realizadas em lâminas sangüíneas coradas pelo método de Giemsa.

PLASMODIUM FALCIPARUM

• Formas encontradas no sangue periférico: trofozoítos jovens e gametócitos.

• Aspectos dos eritrócitos infectados: normal. Raras granulações de Maurer.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

• Trofozoíto jovem: citoplasma delgado. Cromatina pequena e saliente (forma em anel) ou dupla. Freqüente poliparasitismo. Raramente granulações de Maurer.

• Trofozoíto maduro: Raro no sangue periférico. Pequeno e compacto. Citoplasma espesso. Cromatina indistinta.

• Esquizonte: Raro no sangue periférico. Geralmente arredondado. Citoplasma pouco deformado. Cromatina em grânulos grossos.

• Número de merozoítos no esquizonte: 6 – 32 (média = 23).

• Macrogametócito: alongados e curvos, em forma de crescente ou foice, com citoplasma azul intenso e núcleo denso, cercado de pigmento malárico.

• Microgametócito: mais curto e menos encurvado com citoplasma fracamente corado, cromatina difusa e pigmento malárico disseminado.

• Pigmento malárico: negro, grosso e evidente (Fig. 38.20).

Observações: Ver Tabela 15.1 — Características morfológicas das formas das diferentes espécies causadoras da malária humana. (Descrição de CJF Fontes)

PLASMODIUM VIVAX

• Formas encontradas no sangue periférico: trofozoítos jovens, trofozoítos maduros, esquizontes e gametócitos.

• Aspectos dos eritrócitos infectados: aumentado. Freqüentes granulações de Schüffner.

• Trofozoíto jovem: citoplasma espesso. Núcleo com cromatina única e interna. Raro poliparasitismo.

• Trofozoíto maduro: citoplasma irregular e com aspecto amebóide. Cromatina isolada.

• Esquizonte: forma amebóide. Citoplasma irregular vacuolizado. Cromatina segmentada.

• Número de merozoítos no esquizonte: 12 – 24 (média = 16).

• Macrogametócito: citoplasma abundante, arredondado ou oval, núcleo grande, cromatina pouco densa. Ocupa quase todo volume do eritrócito. Citoplasma cora-se de azul.

• Microgametócito: citoplasma azul-pálido e a cromatina azul frouxa.

• Pigmento malárico: marrom-claro e pouco evidente (Fig. 38.21).

Observações: Ver Tabela 15.1 — Características morfológicas das formas das diferentes espécies causadoras da malária humana. (Descrição de CJF Fontes)

PLASMODIUM MALARIAE

• Formas encontradas no sangue periférico: trofozoítos jovens e maduros, esquizontes e gametócitos.

• Aspectos dos eritrócitos infectados: normal. Raras granulações de Ziemann.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

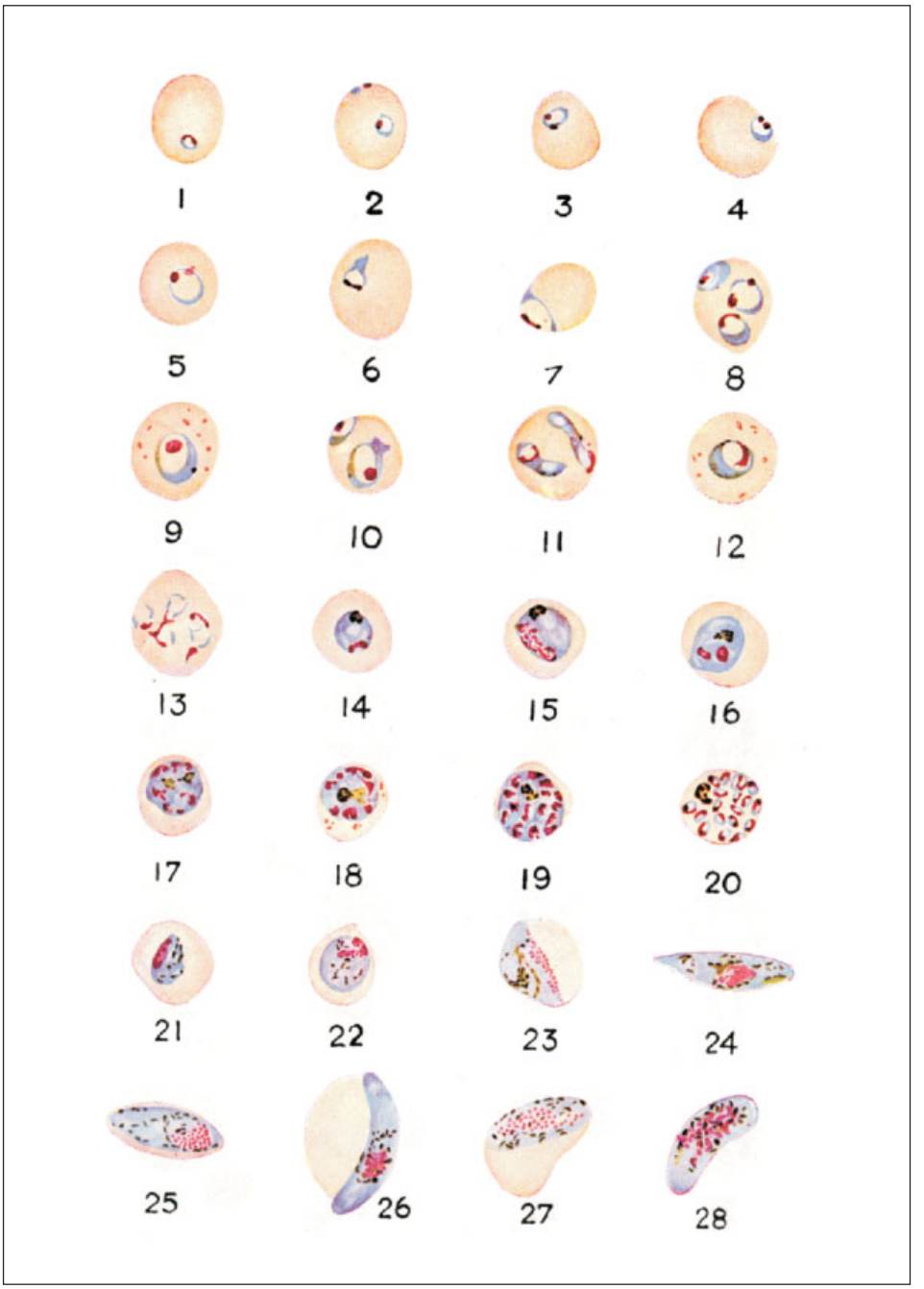


Fig. 38.20 — Plasmodium falciparum*: 1 = Trofozoíto jovem em forma de anel; 2 = Poliparasitismo com trofozoítos jovens (com localização marginal e excêntrica na célula); 3 e 4 = Trofozoítos jovens mostrando cromatina dupla; 5, 6 e 7 = Trozoítos jovens em desenvolvimento; 8 = Três trofozoítos médios em uma célula s; 9 = Trofozoíto jovem, célula mostrando as granulações de Maurer; 10 e 11 = Dois trofozoítos em cada uma das células, mostrando as variações de forma que os parasitos podem assumir; 12 = Trofozoíto maduro, granulações de Maurer através do citoplasma da célula; 13 = Formas delgadas de trofozoítos; 14 = Trofozoíto maduro mostrando pigmento malárico grosso; 15 = Parasito em processo inicial de divisão da cromatina; 16, 17, 18 e 19 = Várias fases de desenvolvimento do esquizonte; 20 = Esquizonte maduro; 21, 22, 23 e 24 = Sucessivas formas de desenvolvimento do gametócito (usualmente não é encontrado no sangue periférico); 25 = Macrogametócito imaturo; 26 = Macrogametócito maduro; 27 = Microgametócito imaturo; 28 = Microgametócito maduro. (Cortesia do* National Institutes of Health, USPHS.*)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

• Trofozoíto jovem: citoplasma espesso. Núcleo com cromatina média e única. Ocupa 1/3 do volume do eritrócito.

• Trofozoíto maduro: citoplasma compacto, arredondado. Cromatina pouco visível. Disposição em faixa equatorial no eritrócito.

• Esquizonte: cromatina pouco segmentada. Posição em banda equatorial. Hipoparasitemia.

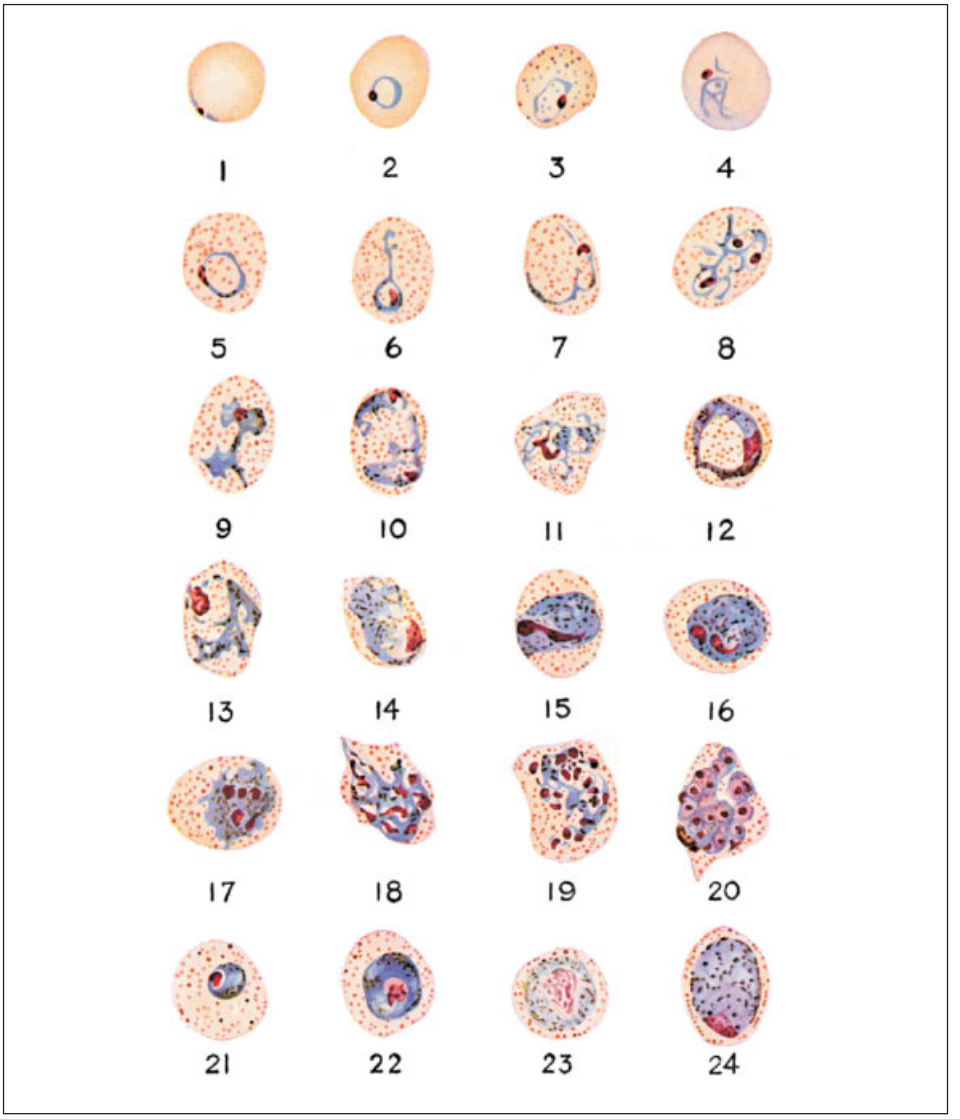


Fig. 38.21 — Plasmodium vivax*: 1 = Eritrócito de tamanho normal com trofozoíto marginal; 2 = Trofozoíto jovem em um macrócito; 3 = Trofozoíto maduro em eritrócito, mostrando granulações basófilas; 4 = Eritrócito policromatofílico contendo um parasito jovem com pseudópodes; 5 = Trofozoíto em forma de anel, mostrando pigmento no citoplasma em célula aumentada de volume, com granulações de Schüffner; 6 e 7 = Trofozoítos médios; 8 = Três trofozoítos jovens amebóides com citoplasma em divisão; 9, 11, 12 e 13 = Trofozoítos amebóides velhos em processo de desenvolvimento; 10 = Dois trofozoítos amebóides em uma célula; 14 = Trofozoíto maduro; 15 = Trofozoíto maduro com cromatina aparente em processo de desenvolvimento; 16, 17, 18 e 19 = Esquizontes mostrando fases progressivas de divisão; 20 = Esquizonte maduro; 21, 22 = Gametócitos em desenvolvimento; 23 = Microgametócito maduro; 24 = Macrogametócito maduro. (Cortesia do* National Institutes of Health, USPHS*.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

• Número de merozoítos no esquizonte: 6 –12 (média = 8). Em forma de roseta.

• Macrogametócito: semelhante ao do *P. vivax*, diferindo apenas por seu tamanho menor.

• Microgametócito: cromatina única, menos distinta e mais difusa.

• Pigmento malárico: marrom-escuro, grosseiro e evidente (Fig. 38.22).

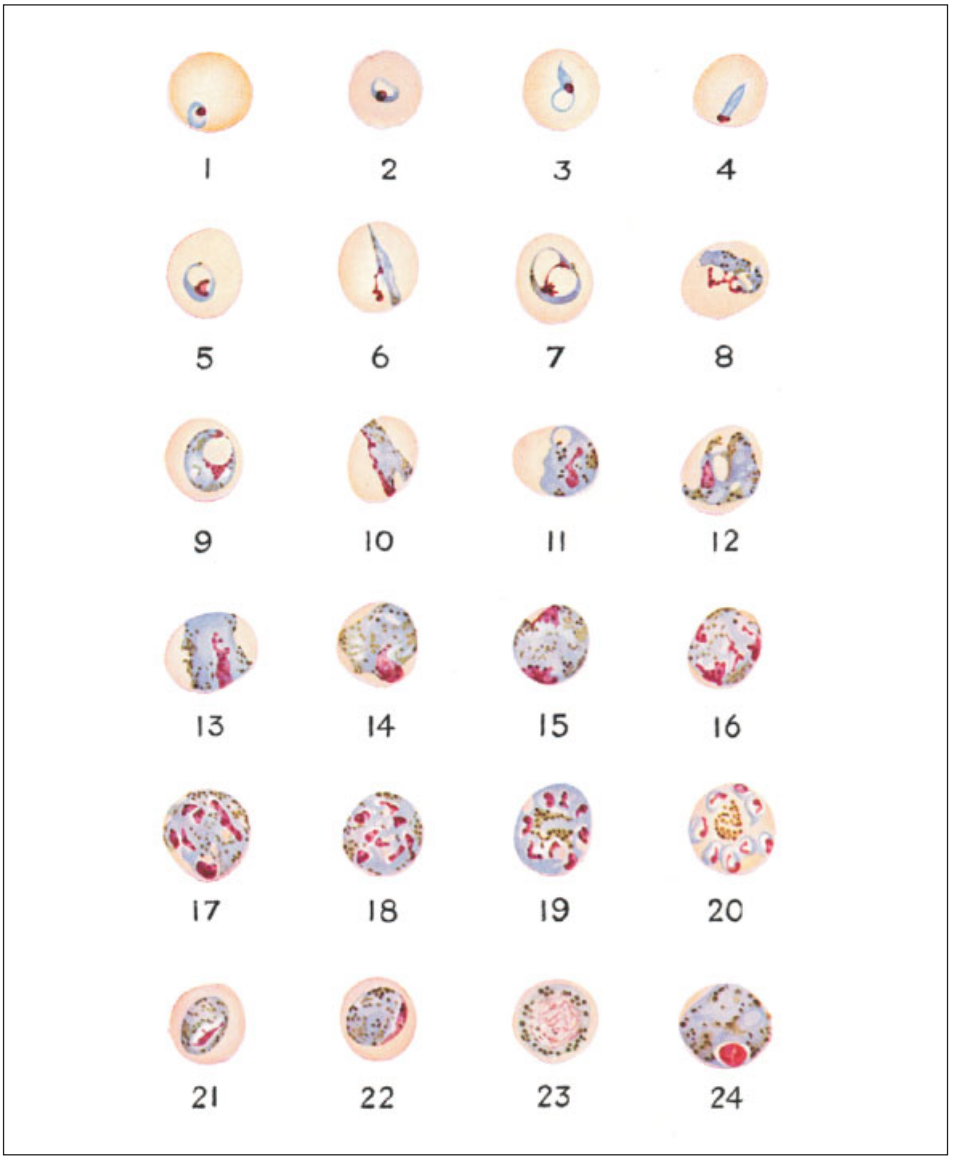


Fig. 38.22 — Plasmodium malariae*: 1 = Trofozoíto jovem; 2, 3 e 4 = Trofozoítos jovens do parasito mostrando um gradual aumento da cromatina e do citoplasma; 5 = Desenvolvimento da forma em anel do trofozoíto, mostrando grânulos de pigmento; 6 = Faixa equatorial prematura do trofozoíto — alongamento da cromatina e alguns pigmentos aparentes; 7, 8, 9, 10, 11 e 12 = Formas de desenvolvimento apresentadas pelos trofozoítos médios; 13 e 14 = Trofozoítos maduros, um dos quais em disposição equatorial no eritrócito; 15, 16, 17, 18 e 19 = Fases de desenvolvimento dos esquizontes; 20 = Esquizonte maduro; 21 = Microgametócito imaturo; 22 = Macrogametócito imaturo; 23 = Microgametócito maduro; 24 = Macrogametócito maduro. (Cortesia do* National Institutes of Health, USPHS.*)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Observações: Ver Tabela 15.1 — Características morfológicas das formas das diferentes espécies causadoras da malária humana. (Descrição de CJF Fontes)

PLASMODIUM OVALE

• Formas encontradas no sangue periférico: trofozoítos jovens, trofozoítos maduros, esquizontes e gametócitos.

• Aspectos dos eritrócitos infectados: aumentado e oval. Granulações de Schüffner.

• Trofozoíto jovem: citoplasma espesso. Núcleo com cromatina única e interna.

• Trofozoíto maduro: citoplasma irregular e com aspecto amebóide. Cromatina isolada.

• Esquizonte: forma amebóide. Citoplasma irregular vacuolizado. Cromatina segmentada.

• Número de merozoítos no esquizonte: 6 – 14 (média = 8).

• Macrogametócito: semelhante ao do *P. vivax*, diferindo apenas por seu tamanho menor.

• Microgametócito: cromatina difusa.

• Pigmento malárico: marrom-escuro e evidente (Fig. 38.23).

Observações: Ver Tabela 15.1 — Características morfológicas das formas das diferentes espécies causadoras da malária humana. (Descrição de CJF Fontes)

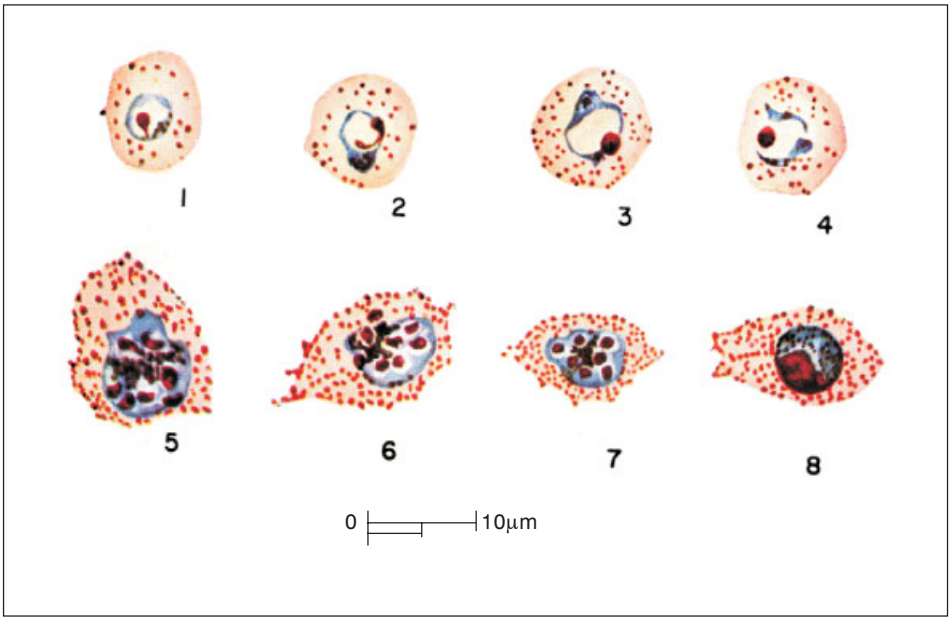


Fig. 38.23 — Plasmodium ovale*: 1 = Trofozoíto jovem; 2, 3 e 4 = Trofozoítos maduros; 5, 6 e 7 = Esquizontes; 8 = Gametócito maduro. (Cortesia do National Institutes of Health, USPHS.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Pneumocystis carinii (fungo)

Ver Capítulo 37.

Trofozoítos

O trofozoíto é pequeno, apresentando formas pleomórficas; com tamanho de 1-5μm e possui um núcleo[3] (Fig. 38.24).

Cistos

Este organismo possui os estágios de cisto e pré-cisto. O pré-cisto é esférico na forma e mede aproximadamente 4-7μm de diâmetro, não contém corpos intracísticos, mas pode conter um ou mais núcleos. O clássico estágio de cisto, com parede cística grossa, é arredondado, com tamanho aproximado de 5-8μm, contendo oito ou mais corpos intracísticos (algumas vezes referidos como esporozoítos)[3] (Fig. 38.24).

DIAGNÓSTICO DOS HELMINTOS

O reconhecimento dos estágios dos helmintos que ocorrem nas fezes é uma habilidade adquirida com a experiência. O diagnóstico das infecções por helmintos que ocorrem no trato intestinal e em órgãos associados depende primeiramente do encontro de ovos, larvas ou proglotes nas fezes ou

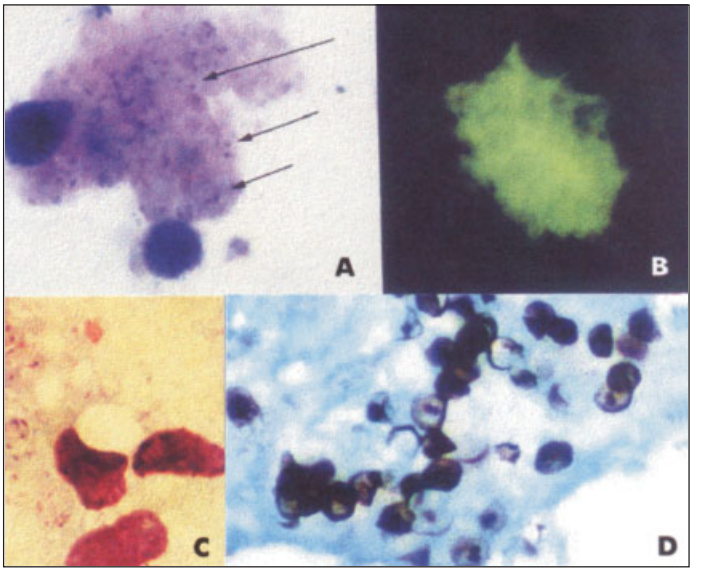


Fig. 38.24 — Pneumocytis carinii*: A = Trofozoíto corado pelo método de Giemsa, em lavado broncoalveolar (LBA). Os trofozoítos são pequenos; as setas indicam somente os núcleos corados em púrpura; B = Imunofluorescência indireta, usando anticorpos monoclonais contra* P. carinii*; C = Três cistos de lavado broncoalveolar (LBA), corados pelo método de Giemsa, os estágios são redondos e contêm de seis a oito corpos intracelulares, a parede dos cistos não está corada; D = Cistos de tecido pulmonar, corados pelo método da prata; as paredes dos cistos coram-se de preto; os corpos intracelulares não são observados por esse método de coloração. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

em material aspirado do intestino. Com exceção de *Enterobius* e *Ascaris*, adultos de nematóides, raramente são encontrados nas fezes, embora adultos de *Strongyloides* podem ser obtidos por aspirado duodenal. Vermes adultos de trematódeos não são observados nas fezes, mas a passagem de proglotes é uma característica de algumas infecções por cestóides. Todos os trematódeos, a maioria dos nematóides e alguns cestóides produzem ovos que são eliminados nas fezes e o exame desse material é a principal chave para o diagnóstico das infecções intestinais. Os ovos de determinadas espécies de parasitos tendem a ser de tamanho, forma, cor e estágios de desenvolvimento relativamente uniformes. Entretanto, podem ocorrer exceções com alguns ovos de nematóides, inférteis ou afetados por anti-helmínticos; nessas condições, os ovos podem ser alterados consideravelmente na aparência e de difícil reconhecimento. Os principais critérios para a identificação de ovos de helmintos são os seguintes:

Tamanho: Os ovos dos helmintos podem variar no tamanho, de pequenos (25 a 30μm de comprimento) a grandes (150μm ou maiores). Os ovos dos vermes cilíndricos (nematóides) que parasitam o homem geralmente têm uma faixa de tamanho que varia de 45 a 90μm. Quando ovos dos vermes achatados (cestóides) são encontrados nas fezes, dependendo da espécie, seus tamanhos podem variar de 30 a 85μm de comprimento. Os ovos dos trematódeos exibem o maior intervalo de tamanho: do menor dos ovos de helmintos (25 a 30μm de comprimento) aos maiores, produzidos pela *Fasciola* e *Fasciolopsis* e por alguns esquistossomos. Devido à uniformidade do tamanho que ocorre em algumas espécies é essencial a medida das dimensões que pode ser realizada através do micrômetro ocular, durante o trabalho de diagnóstico.

Forma: A forma é uma característica relativamente constante para os ovos de todas as espécies; os quais podem ser redondos, ovais ou alongados. Exceções ocorrem quando ovos inférteis são produzidos (*Ascaris* é um bom exemplo) ou quando anti-helmínticos são usados no tratamento das infecções parasitárias (os ovos de *Trichuris*, por exemplo, podem apresentar alterações substanciais).

Casca dos Ovos: As cascas dos ovos de helmintos intestinais podem apresentar cor e podem ser de espessura variada. As cascas dos ovos de algumas espécies são incolores, enquanto às de outras espécies podem ser amarelas ou marrom-amareladas, devido à coloração pela bile. A cor torna-se mais evidente com o aumento da espessura da casca. Em determinadas espécies a espessura é uma característica relativamente consistente, que geralmente muda somente quando os ovos são inférteis. Exemplos típicos de ovos de casca abundante são aqueles do *Ascaris*, *Trichuris* e *Enterobius*, enquanto os ancilostomídeos (*Necator* e *Ancylostoma*) apresentam casca de espessura fina. Entretanto, ovos inférteis de *Ascaris* têm casca mais fina que os ovos férteis. Ovos de helmintos com casca delgada podem desintegrar-se quando submetidos às soluções de alta densidade específica (soluções usadas nos procedimentos de concentração). Além da cor e espessura, outras modificações podem ocorrer na casca do ovo, como a presença da camada mamilonada (*Ascaris*), extremidades arrolhadas por uma massa mucóide transparente (*Trichuris* e *Capillaria*), estrias da casca (*Taenia*),

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

espículos (*Schistosoma*), protuberâncias (*Diphyllobothrium* e *Clonorchis*) e opérculos (*Diphyllobothrium* e outros trematódeos). O tamanho do opérculo e a presença de "sombras" são aspectos importantes na identificação dos ovos.

Estágios de Desenvolvimento: Os estágios de desenvolvimento dos parasitos são chaves características na identificação. Ovos dos nematóides em amostras deixadas à temperatura ambiente por períodos prolongados podem embrionar e mesmo eclodir (os ovos dos ancilostomídeos), o que dificulta o diagnóstico. Os ovos da maioria dos cestóides (*Taenia* e *Hymenolepis*) possuem o embrião hexacanto (oncosfera). Os ovos dos esquistossomos e os menores ovos dos trematódeos contêm um miracídio ciliado. Os ovos inférteis da maioria dos helmintos possuem uma massa desorganizada composta de grânulos e glóbulos de gordura com casca apresentando estrutura refringente. Os ovos de algumas espécies freqüentemente possuem artefatos fecais aderidos à superfície da casca, o que pode mascará-los (*Schistosoma japonicum*), ou aglomerados de leucócitos aderidos à superfície (*S. haematobium* em amostras de urina), que podem dificultar a diferenciação de outros materiais do fundo da preparação. A única larva de nematóide rotineiramente encontrada nas fezes ou em aspirados duodenais é a do *S. stercoralis*. Larvas de ancilostomídeos podem ser encontradas em amostras fecais mantidas à temperatura ambiente por um dia ou mais; nesses casos, elas devem ser diferenciadas das larvas do *Strongyloides*. Outras larvas de nematóides podem ser observadas no diagnóstico laboratorial, incluindo as de *Enterobius* (raramente encontradas nas fezes)[18], de *Ascaris*, de *Strongyloides* ou de ancilostomídeos, as quais podem ser encontradas recobertas por escarro ou por lavado brônquico. Larvas de nematóides de vida livre podem ser observadas, provavelmente, como resultado da contaminação das amostras, reagentes ou recipientes, ou pela ingestão acidental de alimentos infectados (principalmente vegetais) por esses organismos.

Geralmente, os vermes adultos enviados ao laboratório para identificação são o *Ascaris* e o *Enterobius*. O *A. lumbricoides* passa sozinho ou com as fezes. As fêmeas do *E. vermicularis* podem ser encontradas rastejando na região perianal ou na superfície das fezes recém-emitidas; sua morfologia é facilmente distinguível e não causa confusões na identificação. As proglotes dos cestóides podem também ser encontradas nas fezes, separadas ou em cadeias. O problema final no processo de identificação é a confusão dos ovos ou larvas com outros elementos encontrados nas fezes. Estes incluem células vegetais, pêlos e fibras; grãos de pólen e vários produtos de digestão que podem assemelhar-se com parasitos. Alguns grãos de pólen apresentam semelhança acentuada com ovos de *Taenia*; a identificação conclusiva baseia-se na presença do embrião hexacanto ou oncosfera no interior do ovo (Fig. 38.37C). Pêlos de plantas, particularmente a penugem de pêssegos, são facilmente confundidos com as larvas de nematóides devido à inexperiência dos microscopistas. Embora os pêlos de plantas freqüentemente apresentem uma extremidade arredondada que lembra a extremidade anterior de uma larva de nematóide, a outra extremidade geralmente tem aparência recortada, totalmente diferente da extremidade de uma larva; além disso, o canal central amorfo e refringente do pêlo é distinto do trato alimentar de uma larva de nematóide[1,2,3,4,9,10,12,13,14,17] (Ver Capítulo 6) (Figs. 38.25, 38.26 e 38.27).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

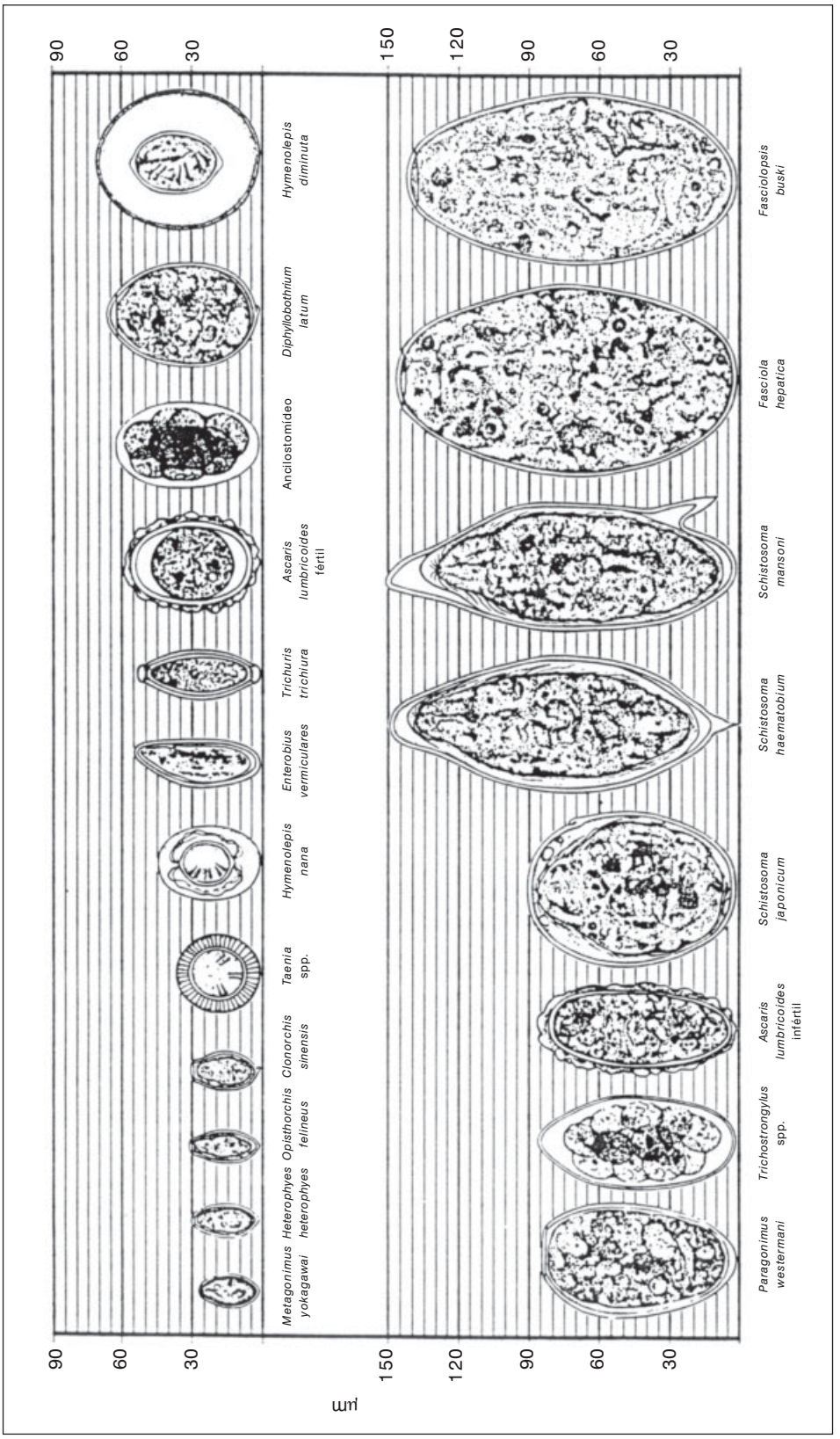


Fig. 38.25 — *Tamanho dos ovos de helmintos encontrados nos espécimes fecais humanos. Escala em micrômetros (μm). (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

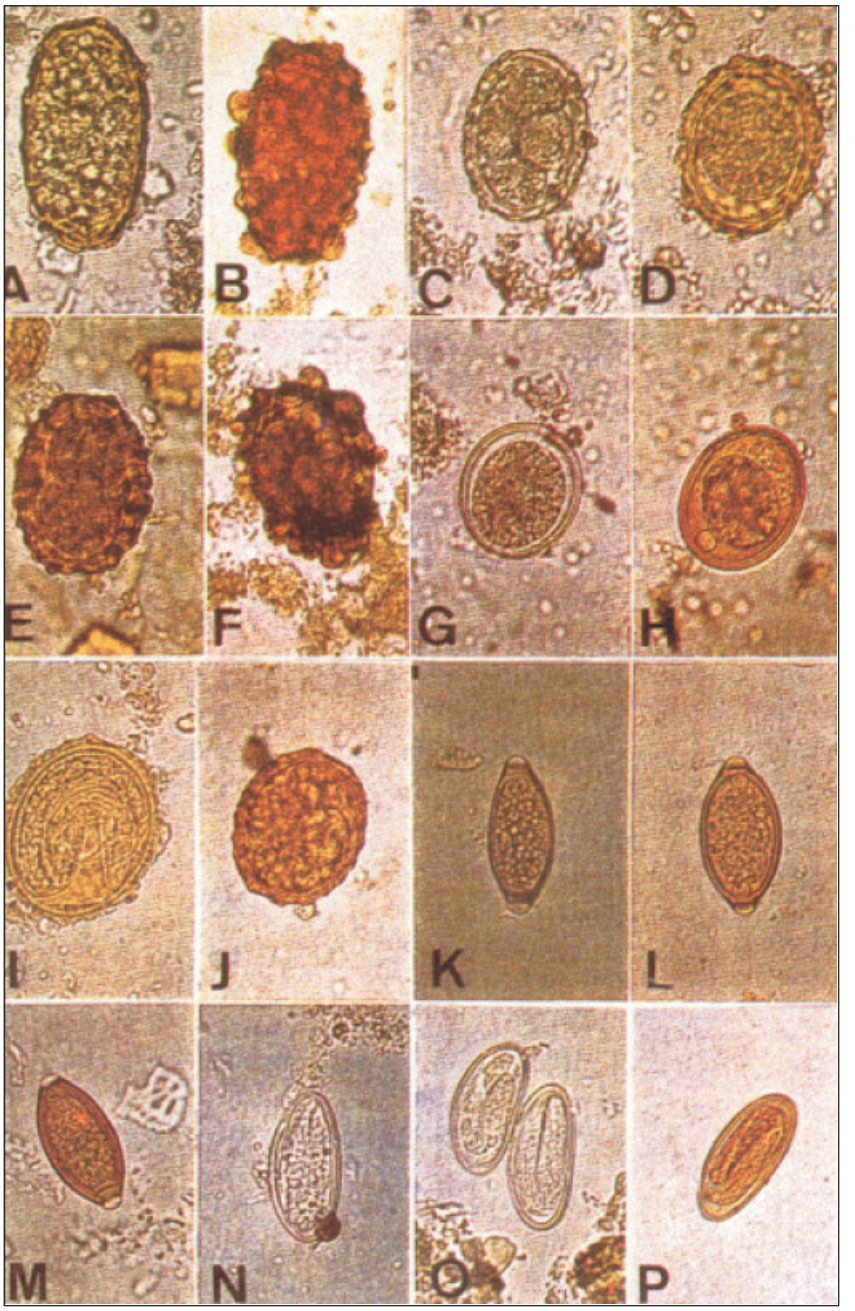


Fig. 38.26 — *Ovos de helmintos: A = Ovo infértil de* Ascaris lumbricoides*; B = Ovo infértil de* Ascaris lumbricoides *corado pela solução de iodo; C = Ovo fértil de* Ascaris lumbricoides*, embrionado, com a casca externa mamilonada; D = Ovo fértil de* Ascaris lumbricoides*, corado pela solução de iodo; E = Ovo fértil de* Ascaris lumbricoides*, corado pela solução de iodo; F = Ovo infértil de* Ascaris lumbricoides*, corado pela solução de iodo; G = Ovo fértil de* Ascaris lumbricoides*, liso (sem a camada protéica — descorticado); H = Ovo fértil de* Ascaris lumbricoides*, liso (sem a camada protéica), corado pela solução de iodo; I = Ovo fértil de* Ascaris lumbricoides*, parcialmente liso e embrionado; J = Ovo fértil de* Ascaris lumbricoides*, embrionado e corado pela solução de iodo; K = Ovo infértil de* Trichuris trichiura*; L = Ovo de* Trichuris trichiura *corado pela solução de iodo; M = Ovo de* Trichuris trichiura *corado pela solução de iodo; N = Ovo não embrionado de* Enterobius vermicularis*; O = Ovo embrionado de* Enterobius vermicularis*; P = Ovo embrionado de* Enterobius vermicularis *corado pela solução de iodo. (Adaptada e reproduzida de Spencer FM, Monroe LS. The Color Atlas of Intestinal Parasites. Springfield (Ill): Charles C. Thomas, Publisher, 1968.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

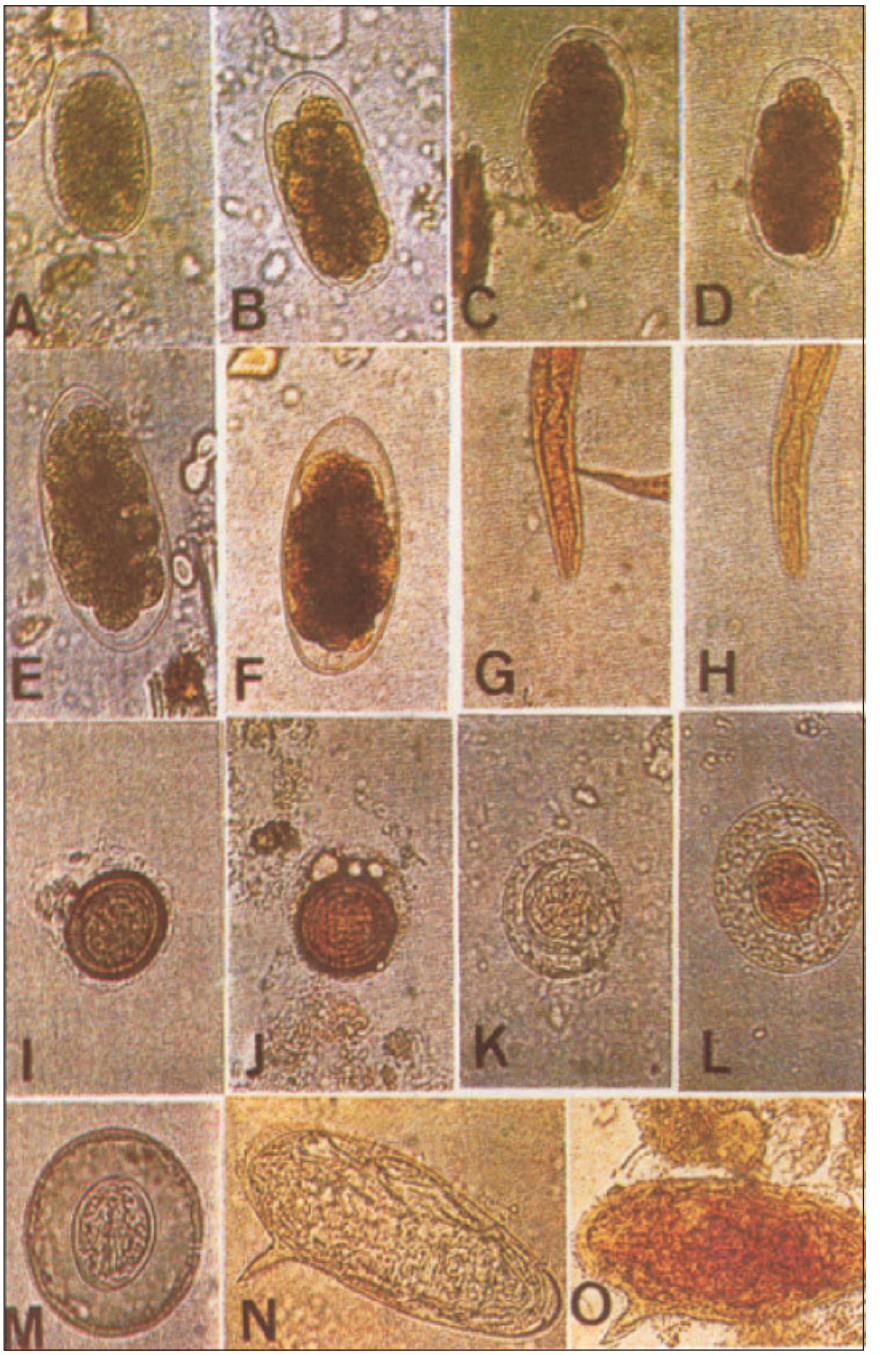


Fig. 38.27 — *Ovos e larvas de helmintos intestinais: A = Ovo não embrionado de* Necator americanus*; B = Ovo embrionado de* Necator americanus *corado pela solução de iodo; C = Ovo embrionado de* Necator americanus *corado pela solução de iodo; D = Ovo embrionado de* Necator americanus*; E = Ovo embrionado de* Trichostrongylus orientalis*; F = Ovo embrionado de* Trichostrongylus orientalis*, corado pela solução de iodo; G = Extremidade anterior e posterior de larva rabditóide de* Necator americanus *corada pela solução de iodo; H = Extremidade anterior de larva rabditóide de* Strongyloides stercoralis *corada pela solução de iodo; I = Ovo de* Taenia saginata*; J = Ovo de* Taenia saginata *corado pela solução de iodo; K = Ovo de* Hymenolepis nana*; L = Ovo de* Hymenolepis nana *corado pela solução de iodo; M = Ovo de* Hymenolepis diminuta*; N = Ovo de* Schistosoma mansoni*; O = Ovo de* Schistosoma mansoni *corado pela solução iodo. (Adaptada e reproduzida de Spencer FM, Monroe LS. The Color Atlas of Intestinal Parasites. Springfield (Ill): Charles C. Thomas, Publisher, 1968.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

NEMATÓIDES INTESTINAIS

Ascaris lumbricoides

Vermes Adultos

O macho mede em geral de 15-31cm de comprimento por 2-4mm de largura. A fêmea mede cerca de 20-35cm de comprimento por 3-6mm de largura, com a cauda afilada. Nos parasitismos intensos, quando o hospedeiro alberga centenas de áscaris, o tamanho é menor, e os exemplares em geral não ultrapassam de 10 a 12cm. A cor do verme é branca. O corpo se afina até os extremos, particularmente na parte anterior. Nas fêmeas a parte posterior é redonda. O macho, de menor tamanho, distingue-se da fêmea pela parte posterior sempre enrolada para o lado ventral, mostrando ainda dois espículos de tamanho igual com 2mm de comprimento.

Ovos

Os ovos têm cor castanha, são grandes, ovais, medindo cerca de 55-75µm x 35-50µm. Os estágios são típicos em razão da membrana mamilonada que possui externamente; essa membrana é apoiada sobre duas outras que conferem ao ovo grande resistência. Internamente, apresentam uma massa de células germinativas. Freqüentemente são encontrados nas fezes ovos inférteis alongados, medindo 85-95µm x 43-47µm, a membrana mamilonada é mais delgada, com citoplasma granuloso. Algumas vezes, ovos férteis podem se apresentar sem a membrana mamilonada (Fig. 38.28).

Trichuris trichiura

Vermes Adultos

O macho mede cerca de 30-45mm. A extremidade posterior é fortemente recurvada ventralmente, apresentando um espículo protegido por bainha. A fêmea mede cerca de 35-50mm com a extremidade posterior romba e reta. Os espécimes adultos apresentam nítida diferença entre a parte anterior e a parte posterior. A porção anterior do corpo é filiforme, afilada e contém o

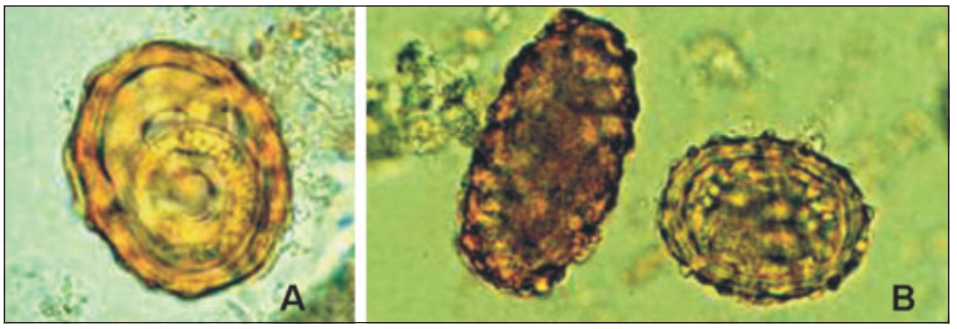


Fig. 38.28 — Ascaris lumbricoides. *A = Ovo fértil; B = Ovos infértil e fértil. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

esôfago. A porção posterior é mais dilatada, contém o intestino e os órgãos genitais. Os vermes são de cor esbranquiçada ou rósea. A relação entre a porção afilada e a dilatada é de 3:2 no macho e de 2:1 na fêmea. Possui nítido dimorfismo sexual, sendo o macho um pouco menor do que a fêmea.

Ovos

Medem cerca de 50-55µm por 20-23µm, com aspecto típico de um pequeno barril, arrolhado nas duas extremidades por uma massa mucóide transparente. A casca é formada por duas membranas que envolvem a massa das células germinativas. O ovo tem cor castanha (Fig. 38.29).

Capillaria philippinensis

Vermes Adultos

A fêmea mede de 2,5-4,3mm e o macho, 2,3-3,17mm. Esses vermes vivem na mucosa do intestino delgado, mais freqüentemente no jejuno.

Ovos

A fêmea produz ovos semelhantes aos de *T. trichiura*. Os ovos medem 36-45µm de comprimento por 21µm de largura, possuem uma casca estriada e proeminências polares inconspícuas em cada extremidade (Fig. 38.30).

Enterobius vermicularis

Vermes Adultos

A fêmea mede cerca de 8-13mm de comprimento por 0,4-0,5mm de diâmetro, com cauda pontiaguda e longa. O macho mede cerca de 2,5mm de comprimento por 0,1-0,2mm de diâmetro. Cauda fortemente recurvada

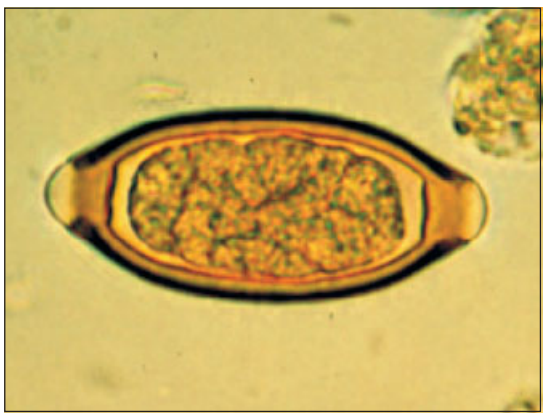


Fig. 38.29 — *Ovo de* Trichuris trichiura*: (exame direto a fresco). (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

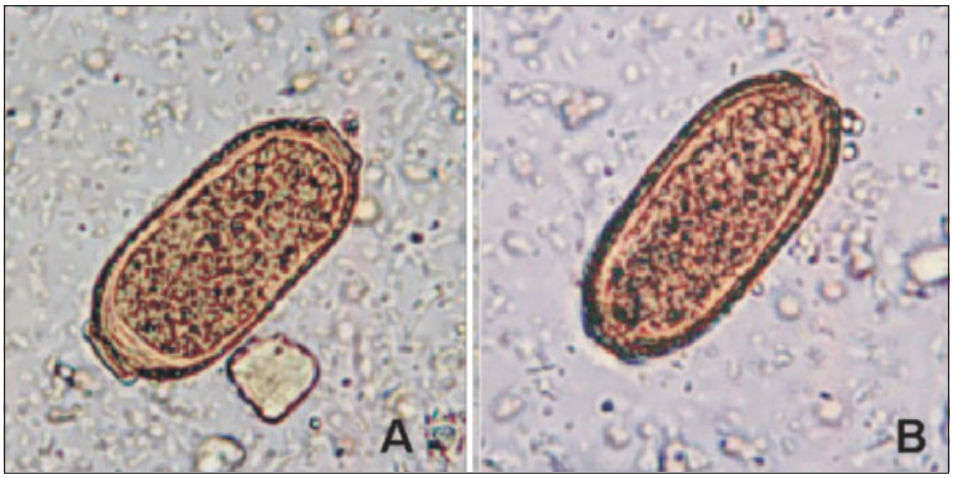


Fig. 38.30 — Capillaria philippinensis*: (exame direto a fresco). A e B = Ovos não embrionados, com forma de "amendoim", medem 36-45 x 21mm, com membrana estriada e imperceptíveis proeminências polares em cada extremidade. Usualmente não são embrionados quando passam com as fezes. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

em sentido ventral, com um espículo presente (100-140μm de comprimento). O verme apresenta nítido dimorfismo sexual; entretanto, alguns caracteres são comuns aos dois sexos: cor branca e filiforme. Na extremidade anterior, lateralmente à boca, em ambos os sexos, notam-se expansões vesiculosas muito típicas, chamadas "asas cefálicas". A boca é pequena, seguida de um esôfago também típico de forma claviforme, terminando em um bulbo cefálico cardíaco.

Ovos

Medem cerca de 50-60μm de comprimento por 20-30μm de largura. Apresentam o aspecto grosseiro de um "D", pois um dos lados é sensivelmente achatado e o outro é convexo. Possuem membrana dupla, lisa e transparente. No momento em que saem da fêmea, já apresentam no seu interior uma larva (parcialmente embrionada) (Fig. 38.31).

Ancylostoma duodenale

Vermes Adultos

O macho mede 8-11mm x 0,4-0,5mm e possui extremidade posterior com bolsa copuladora bem desenvolvida. A fêmea mede 10-13mm de comprimento por 0,5-0,7mm de largura. Os vermes adultos, machos e fêmeas, são cilindriformes, com a extremidade anterior curvada dorsalmente (semelhante a uma letra "C"); cápsula bucal profunda, com dois pares de dentes ventrais na margem interna da boca e um par de lancetas ou dentes triangulares subventrais no fundo da cápsula bucal. Ambos os sexos apre-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte



Fig. 38.31 — Enterobius vermicularis. *A = Ovo não embrionado de* Enterobius vermicularis *(exame direto a fresco); B = Ovo embrionado de* Enterobius vermicularis *(exame direto a fresco); C e D = Ovos embrionados de* Enterobius vermicularis *corados pela solução de iodo. (Adaptado e reproduzido de Spencer FM, Monroe LS. The Color Atlas of Intestinal Parasites. Springfield, Ill: Charles C. Thomas, Publisher, 1968.)*

sentam a cor rósea-avermelhada, quando a fresco, e esbranquiçado, após fixação. O dimorfismo sexual é bem acentuado, tanto pelas maiores dimensões das fêmeas, como, principalmente, pela morfologia externa[10] (Tabela 38.2).

Ovos

Os ovos medem cerca de 55-65 x 36-40μm. Enquanto os ovos do *Trichostrongylus* spp. medem 75-95 x 40-50μm (Fig. 38.32).

Necator americanus

Vermes Adultos

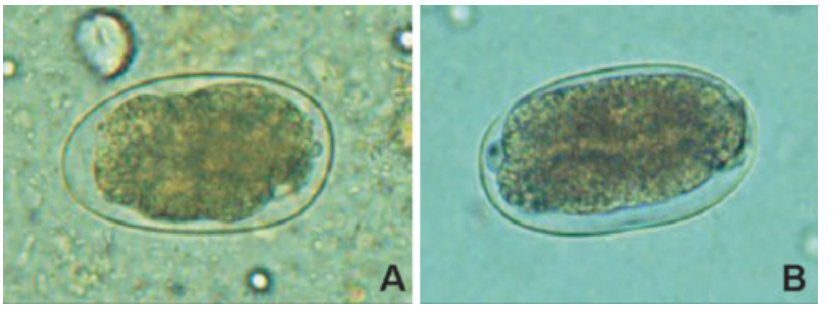
O macho é menor do que a fêmea, medindo 5 a 9mm de comprimento por 0,3mm de largura; bolsa copuladora bem desenvolvida, com espículos que se fundem no final distal. A fêmea mede 9-11mm por 0,4mm. Os adultos (machos e fêmeas) apresentam a extremidade cefálica recurvada dorsalmente (forma de uma letra S); cápsula bucal profunda, com duas lâminas cortantes seminulares, na margem da boca, de situação subventral, e

Tabela 38.2
Caracteres Macroscópicos Diferenciais entre Vermes Adultos de *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*[1,3,4]

	A. duodenale	*N. americanus*
Dimensões	Macho: 8-11mm x 0,4-0,5mm Fêmea: 10-13mm x 0,5-0,7mm	Macho: 5-9mm x 0,3mm Fêmea: 9-11mm x 0,4mm
Forma	Em "C", curva mais ou menos acentuada	Em "S", devido à curvatura posterior da cabeça
Extremidade posterior	Macho: bolsa aberta Fêmea: obturada por espinho	Macho: bolsa fechada Fêmea: delgada

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte



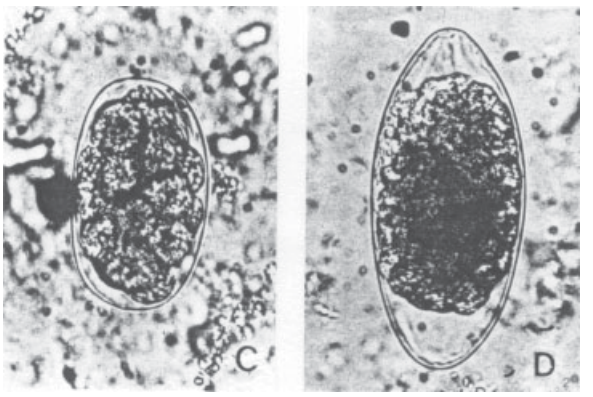


Fig. 38.32 — *A = Ovo de* Ancylostoma duodenale*; B = Ovo de* Necator americanus *(exame direto a fresco). (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA); C = Ovo de Ancilostomídeo; D = Ovo de* Trichostrongylus orientalis*. (Cortesia de Suzuki, N. Human Helminth Eggs. Tokyo: JAPC e JOICFP; 1981.)*

duas outras lâminas cortantes na margem interna, subdorsal; fundo da cápsula bucal com um dente longo, ou cone dorsal, sustentado por uma placa subdorsal e duas lancetas, triangulares subventrais. Espécimes de coloração rósea-avermelhada (a fresco) e esbranquiçados (após a fixação)[10] (Tabela 38.2).

Ovos

Os ovos medem cerca de 60-75µm x 36-40µm, enquanto os ovos do *Trichostrongylus* spp. medem 75-95µm x 40-50µm (Fig. 38.32).

Ovos de Ancilostomídeos

A diferenciação entre os ovos do *Ancylostoma duodenale* e os do *Necator americanus* se faz pelas dimensões. Na prática, porém, seria muito trabalhoso medir um número suficiente de ovos para chegar a um diagnóstico específico; por isso, encontrando os referidos ovos, não é necessário mencionar a espécie a que pertencem, diagnosticando apenas como ovos de ancilostomídeos (os ovos são ovais ou elipsóides, a casca é transparente hialina, tão delgada que dá o aspecto de um contorno linear, quando examinada com aumentos não muito fortes. No interior: dois, quatro, oito ou mais blastômeros, conforme a fase de desenvolvimento) (Fig. 38.32).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Larvas Rabditóides

Essa larva mede cerca de 180-380μm x 14-20μm, com esôfago tipicamente rabditóide (com dilatação nas extremidades e constrição na porção mediana). Apresenta duas características que a diferenciam da larva rabditóide dos ancilostomídeos: vestíbulo bucal curto (nos ancilostomídeos o vestíbulo bucal é longo) e primórdio genital nítido e grande (nos ancilostomídeos é pouco desenvolvido e pouco visível) (Fig. 38.33 e Tabela 38.3).

Larvas Filarióides

Essa larva mede cerca de 600μm x 16μm. Esôfago tipicamente filarióide (cilíndrico e retilíneo). Apresenta cauda entalhada, o que a diferencia da larva filarióide dos ancilostomídeos, que é pontiaguda (Fig. 38.33 e Tabela 38.3).

Tabela 38.3
Características Morfológicas Diferenciais entre as Larvas de Ancilostomídeos e *Strongyloides stercoralis*[3,4,5]

	Ancilostomídeos	*Strongyloides stercoralis*
Larva Rabditóide (Primeiro Estádio Larvário)		
Tamanho	250-350 x 17μm, média, 200-300μm x 14-17μm	180-380 x 14-20μm, média, 200-300μm x 16-10μm
Vestíbulo bucal	Longo (10μm).	Curto (2-3μm)
Esôfago	Menos nítido, 1/3 do comprimento do corpo com duas protuberâncias	Tipicamente rabditóide dilatação nas extremidades e constrição na porção mediana, 1/3 do comprimento do corpo, com duas protuberâncias
Primórdio genital	Imperceptível (pequeno) (7μm)	Proeminente, bem visível, (grande) (22μm)
Poro anal	80μm da extremidade posterior	50μm da extremidade posterior
Larva Filarióide (Terceiro Estádio Larvário)		
Tamanho	600-700 x 17μm média, 500-700 x 20-24μm	600 x 16μm, média, 500-550 x 20-24μm
Bainha	Embainhada	Não embainhada
Cauda	Delgada (pontiaguda)	Bifurcada (entalhada)
Esôfago	Aproximadamente 1/3 do comprimento corpo, sem estar intumescido	Aproximadamente 1/2 do comprimento do corpo, sem estar intumescido; tipicamente filarióide (cilíndrico e retilíneo)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

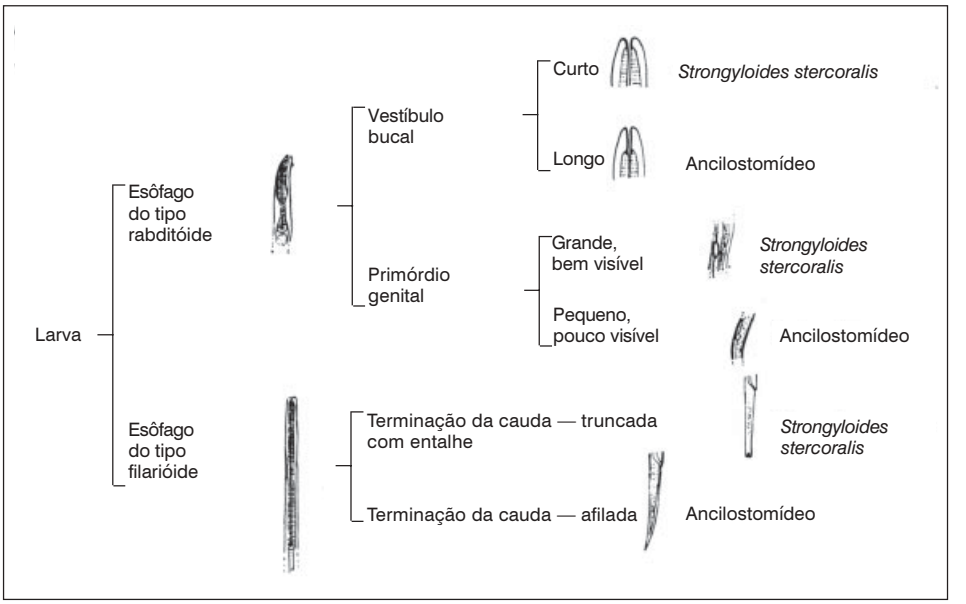


Fig. 38.33 — *Caracteres fundamentais para a diferenciação entre larvas rabditóides e filarióides de ancilostomídeos e* Strongyloides stercoralis *(Segundo Neto Amato V, Campos R. Diagnóstico das Parasitoses Intestinais pelo Exame das Fezes. São Paulo: Livraria Editora Artes Médicas Ltda., 1968)[9].*

NEMATÓIDES DO SANGUE E DOS TECIDOS

WUCHERERIA BANCROFTI

Vermes Adultos

Os vermes são filiformes. Os machos medem 40mm de comprimento por 0,1mm de diâmetro e as fêmeas 8-100mm por 0,25mm.

Microfilárias

As microfilárias possuem bainha (embainhada). Em esfregaços corados, medem 260μm (variando entre 244-296μm) por 7,5-10μm de diâmetro; cauda pontuada com núcleos somáticos grandes, largos e bem separados; núcleos caudais em fila única (não se estendem até a ponta da cauda), grandes e bem separados, espaço caudal presente (ver Capítulo 19 — Diagnóstico Laboratorial da Filariose Bancroftiana) (Tabela 38.4 e Fig. 38.4).

MANSONELLA OZZARDI

Vermes Adultos

Os vermes são longos, delgados e filiformes. Os machos medem 24-28mm de comprimento por 0,07 x 0,08mm de diâmetro e as fêmeas 32-62mm por 0,13-0,16mm.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Tabela 38.4
Características Diferenciais entre as Várias Espécies de Filárias[2,3,18]

Espécies	*W. bancrofti*	*M. ozzardi*	*O. volvulus*	*M. perstans*
Microfilárias				
Localização	Sangue	Sangue	Pele	Sangue
Bainha	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
Comprimento (μm)	260(244-296)	200(173-240)	254(221-287)	195(190-200)
Diâmetro (μm)	7,5-10	3-4	5-9	4-5
Forma da cauda	Pontuda	Pontuda	Ponta fina	Redonda
Núcleos caudais	Presentes*	Presentes*	Presentes*	Presentes**
Periodicidade	Noturna***	Não periódica	Não periódica	Não periódica
Vermes adultos				
Macho				
Comprimento	40mm	24-28mm	19-42mm	45mm
Diâmetro	0,1mm	0,07-0,08mm	0,13-0,21mm	60μm
Fêmea				
Comprimento	80-100mm	32-62mm	33-50cm	70-80mm
Diâmetro	0,25mm	0,13-0,16mm	0,27-0,40mm	120μm

*Os núcleos caudais não se estendem até a ponta da cauda.
**Os núcleos caudais continuam até a ponta da cauda.
***Periodicidade noturna e subperiódica.

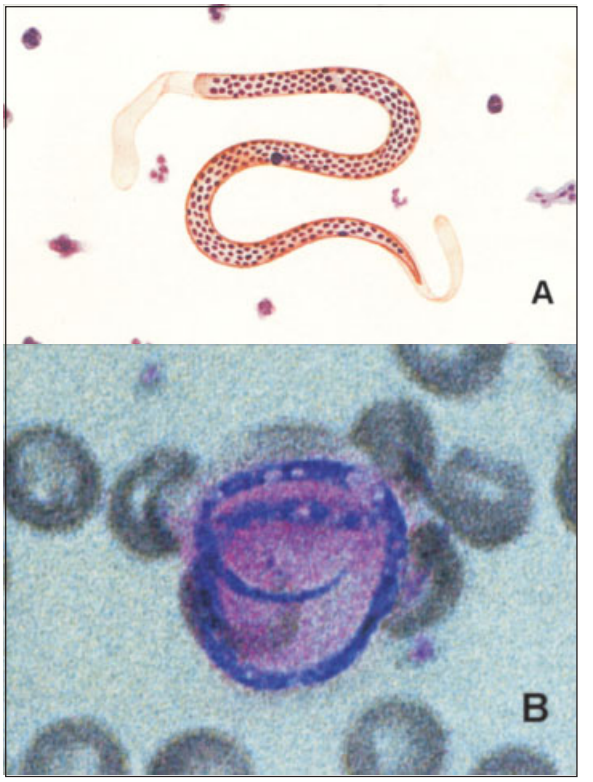


Fig. 38.34 — *A = Microfilária de* Wuchereria bancrofti. *Esfregaço estirado corado pelo método de Giemsa. (Cortesia — Laboratory Procedures in Parasitology, Department of the Army, EUA; 1961) B = Artefato — micélio do fungo* Helicosporum. *(Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Microfilárias

As microfilárias medem 200µm (variando entre 173-240µm) por 3-4µm de diâmetro; ausência de bainha; cauda pontuada com núcleos caudais em fila única (os quais não se estendem até a ponta da cauda), porém estreitos e confluentes; espaço caudal presente; núcleos somáticos menores e muito próximos uns dos outros.

Onchocerca volvulus

Vermes Adultos

Os machos medem 19-42mm de comprimento por 0,13-0,21mm de diâmetro e as fêmeas 33-50cm por 0,27-0,40mm.

Microfilárias

As microfilárias não possuem bainha, medem 254µm (variando entre 221-287µm) por 5-9µm de diâmetro. A cauda é pontuada e os núcleos caudais não se estendem até a ponta da cauda.

Angiostrongylus costaricensis

Vermes Adultos

Os machos medem 20mm de comprimento e 0,28mm de largura. O corpo é filiforme com a extremidade caudal levemente encurvada, terminando em uma bolsa copuladora pouco desenvolvida com dois espículos. As fêmeas medem 33mm de comprimento, o corpo é filiforme com a extremidade cefálica arredondada e cauda cônica. A boca tem três pequenos lábios, o ânus e a vulva estão localizados ventralmente na extremidade caudal (ver Capítulo 17) (Fig. 38.35).

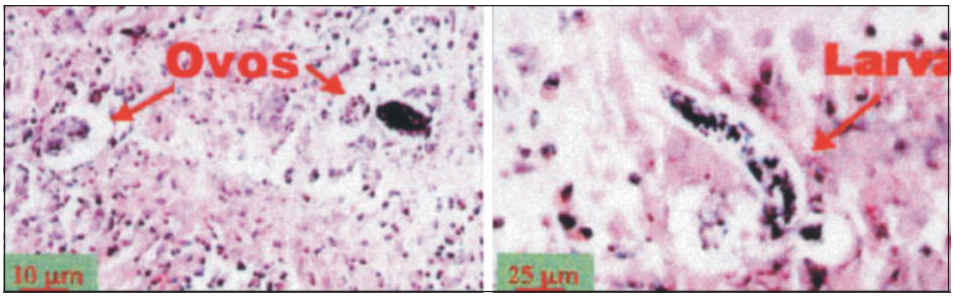


Fig. 38.35 — Angiostrongylus costaricensis*. A = Ovos; B = Larva. Ovos e larvas (ocasionalmente vermes adultos) do* A. costaricensis *podem ser identificados em biópsias ou em espécimes cirúrgicos do tecido intestinal. As larvas devem ser diferenciadas das larvas do* Strongyloides stercoralis*; entretanto, a presença de granulomas contendo ovos com casca fina e/ou larvas, são elementos importantes para distinguir a infeção pelo* A. costaricensis *do* S. stercoralis*. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CESTÓIDES INTESTINAIS

TAENIA SOLIUM E *TAENIA SAGINATA*

Vermes Adultos

As tênias são divididas morfologicamente em escólex ou cabeça, colo ou pescoço e estróbilo ou corpo. **Escólex**: É um órgão adaptado para a fixação do cestóide na mucosa do intestino delgado. Apresenta quatro ventosas formadas de tecido muscular, arredondado e proeminente. A *T. solium* possui um rostelo ou rostro armado com uma dupla coroa de acúleos, fileira de 25-50 acúleos de aspecto falciforme, com lâmina, guarda e cabo; ventosa pouco desenvolvida; 1mm de diâmetro (tênia armada). A *T. saginata* não possui rostelo (tênia inerme); escólex quadrangular; ventosas bem desenvolvidas; com 1,5-2mm de diâmetro. **Colo:** Está situado imediatamente abaixo do escólex; não tem segmentação. É conhecido como zona de crescimento ou de formação das proglotes. **Estróbilo:** É o corpo do helminto, formado pela união de proglotes (anéis), podendo ter de 800 a 1.000, e atingir 2-7 metros na *T. solium* ou ter mais de 1.000 proglotes e atingir 4-8 metros na *T. saginata*. **Proglotes:** As proglotes são subdivididas em jovens, maduras e grávidas. As proglotes jovens são mais curtas do que largas e já apresentam o início do desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos. A proglote grávida da *T. solium* é quadrangular, sendo o útero formado em média por 9 (7-13 ramos laterais) pares de ramificações do tipo dentrítica, contendo aproximadamente 80 mil ovos, enquanto a proglote de *T. saginata* é retangular, apresentando um útero formado em média por 18 (15-20 ramos laterais) ramificações uterinas do tipo dicotômico, contendo até 160 mil ovos (Fig. 38.36 e 38.37).

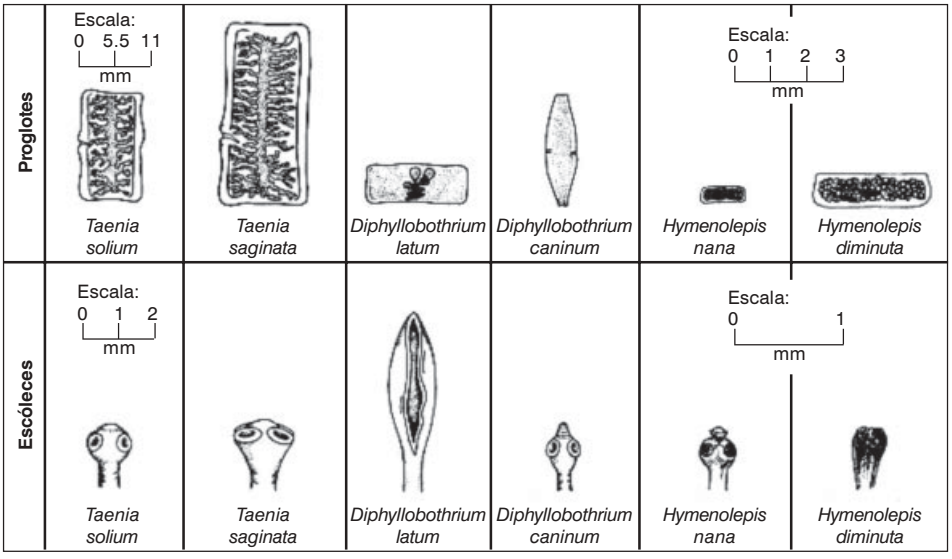


Fig. 38.36 — *Proglotes grávidas e escóleces de cestóides parasitos do homem. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

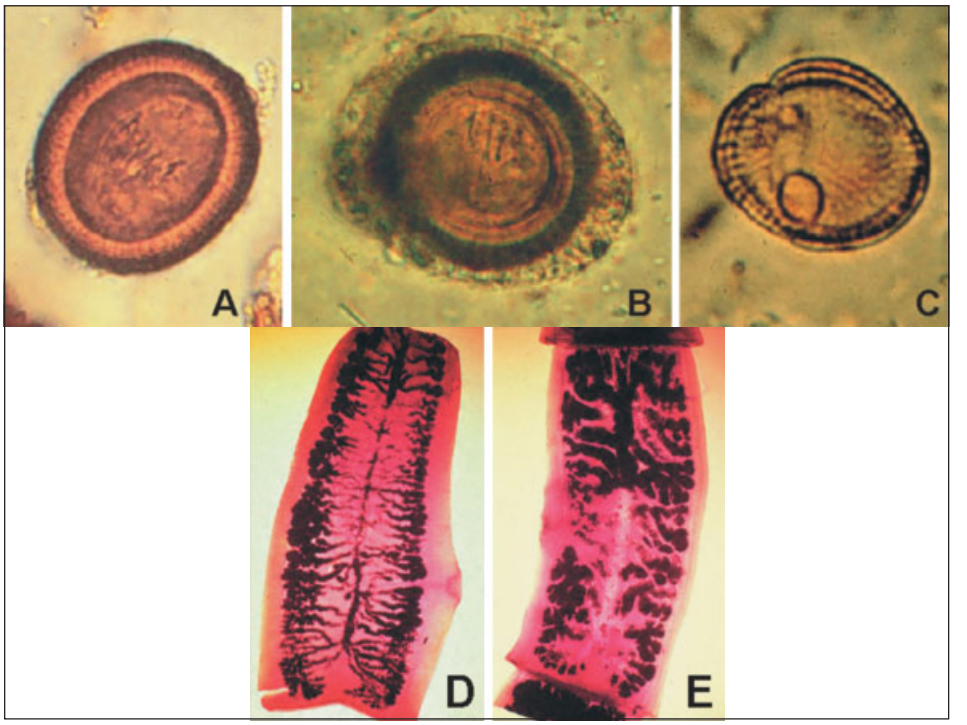


Fig. 38.37 — *A e B = Ovos de* Taenia *spp.; C = Artefato: grão de pólen; Proglotes grávidas: D =* Taenia saginata*; E =* Taenia solium *(A injeção de tinta da China — Nanquim — no útero das proglotes permite a visualização das ramificações uterinas). (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

Ovos

Microscopicamente é impossível diferenciar os ovos das duas tênias. Eles são esféricos e medem 31-43µm de diâmetro; são constituídos por uma casca protetora denominada embrióforo, espesso, estriado, formado por prismas truncados inteiramente unidos entre si. Dentro do embrióforo, encontra-se a oncosfera ou embrião hexacanto com dupla membrana e três pares de acúleos. Encontrando-se nas fezes humanas o diagnóstico é de ovos de *Taenia* spp (Fig. 38.37A, B).

Cisticerco

O *Cysticercus cellulosae*, larva da *T. solium* é constituído de escólex com quatro ventosas, rostelo, colo e uma vesícula membranosa contendo líquido no seu interior. O *Cysticercus bovis* é a larva da *T. saginata*, apresenta a mesma morfologia do *C. cellulosae*, diferindo apenas pela ausência do rostelo. Estas larvas podem atingir até 12 milímetros de comprimento.

Hymenolepis nana

Vermes Adultos

O verme mede 2,5-4cm de comprimento. Escólex com quatro ventosas

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

e um rostelo curto apresentando uma coroa de 24-40 acúleos; região cervical bastante longa, seguindo-se-lhe 100-200 proglotes, sempre mais largas que compridas; átrios genitais unilaterais (Fig. 38.36).

Ovos

São quase esféricos, medindo cerca de 30-47µm de diâmetro são transparentes e incolores. Apresentam membrana externa delgada envolvendo um espaço claro; mais internamente apresentam outra membrana envolvendo a oncofera (com três pares de acúleos). Essa membrana interna apresenta dois espessamentos polares (mamelões) claros em posições opostas, dos quais partem 4-8 filamentos longos. Esse ovo é conhecido como "chapéu de mexicano" quando visto de cima (Fig. 38.38B).

Hymenolepis diminuta

Vermes Adultos

O verme mede 20-60cm de comprimento. Escólex com quatro ventosas e um rostelo curto sem acúleos. As proglotes são mais largas do que longas (Fig. 38.36).

Ovos

Os ovos são subesféricos, de cor amarelada, membrana externa transparente e medem de 70-85 x 60-80µm, não possuem os filamentos polares. Os ovos de *H. diminuta* diferem dos de *H. nana* por serem maiores, quase o dobro; cápsula externa mais espessa, de coloração amarelada; cápsula interna sem mamilos; ausência de filamentos entre ambas as cápsulas. Oncosfera com três pares de acúleos (Fig. 38.38A).

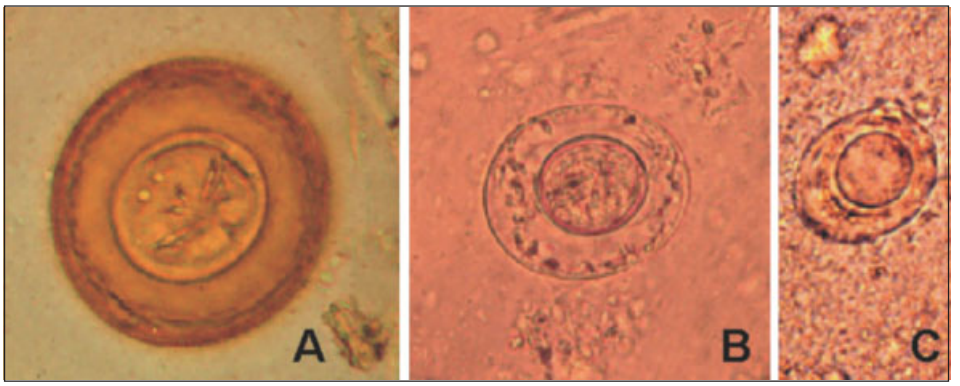


Fig. 38.38 — *A = Ovo de* Hymenolepis diminuta*.; B = Ovo de* Hymenolepis nana*; C = Artefato (assemelha-se com o ovos da* H. nana*, mas não são visíveis os três pares de acúleos e os filamentos polares). (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

CESTÓIDES DOS TECIDOS

ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

Vermes Adultos

O verme mede cerca de 5mm e possui um escólex globoso, com quatro ventosas e um rostro com acúleos. O colo é curto e o corpo é formado por três ou quatro proglotes: uma ou duas jovens, uma madura e uma grávida, contendo 500 a 800 ovos.

Ovos

O ovo é esférico medindo cerca de 31-43μm de diâmetro, apresentando embrióforo espesso e embrião hexacanto no seu interior.

Areia Hidática

Material obtido por sedimentação do líquido hidático de cisto hidático fértil em copo de sedimentação, constituído por escóleces, vesículas prolígeras e fragmentos destas (Fig. 38.39).

TREMATÓDEOS DO SANGUE, FÍGADO E PULMÕES

SCHISTOSOMA MANSONI

Vermes Adultos

O macho mede cerca de 6,4-12mm. Tem cor esbranquiçada, com tegumento recoberto de minúsculas projeções (tubérculos). Apresenta o corpo

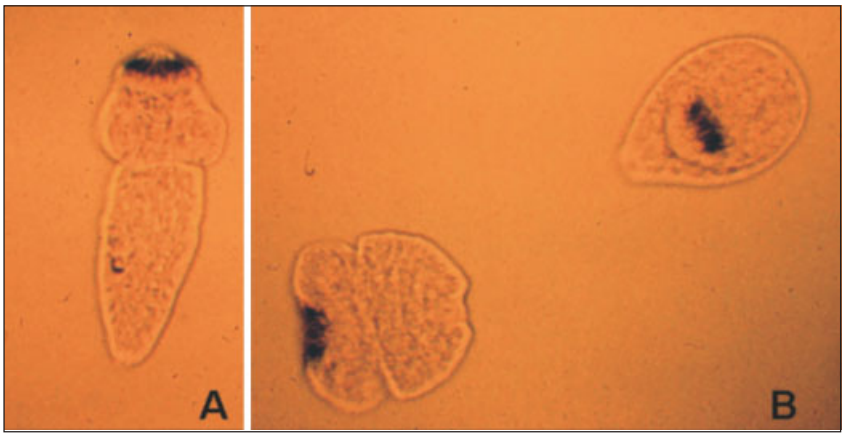


Fig. 38.39 — *Areia hidática — Líquido hidático aspirado de cisto hidático com protoescóleces (tamanho aproximado de 100μm), cada um apresenta os típicos acúleos. Os protoescóleces são normalmente evaginados (A) e invaginados (B), quando colocados na solução salina. (Cortesia* — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, *EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

dividido em duas porções: anterior, na qual se encontram a ventosa oral e a ventosa ventral (acetábulo) e a posterior (que se inicia logo após a ventosa ventral), onde se encontra o canal ginecóforo (fenda longitudinal, para albergar a fêmea e fecundá-la). Em seguida à ventosa oral o esôfago, que se bifurca ao nível do acetábulo e funde-se depois formando um ceco único que irá terminar na extremidade posterior. Logo atrás do acetábulo se encontra de sete a nove massas testiculares que se abrem diretamente no canal ginecóforo (o verme não possui órgão copulador e, assim, os esper-matozóides passam pelos canais deferentes, que se abrem no poro genital, dentro do canal ginecóforo, e aí alcançam a fêmea fecundando-a). A fêmea mede cerca de 7,2-17mm. Tem cor esbranquiçada com tegumento liso. Na metade anterior, se encontra a ventosa oral e o acetábulo; a vulva, o útero (com um ou dois ovos) e o ovário. A metade posterior é preenchida pela glândulas vitelogênicas (ou vitelinas) e o ceco.

Ovos

Medem cerca de 114-175 x 45-70μm, sem opérculo, com um formato oval, sendo que na parte mais longa apresentam um espículo voltado para trás. O que caracteriza o ovo maduro é a presença de um miracídio formado, visível pela transparência da casca. O ovo maduro é a forma usualmente encontrada nas fezes (Fig. 38.40 e 38.42).

Fasciola hepatica

Verme Adulto

Esse verme é um trematódeo hermafrodita. Comum em vias biliares de

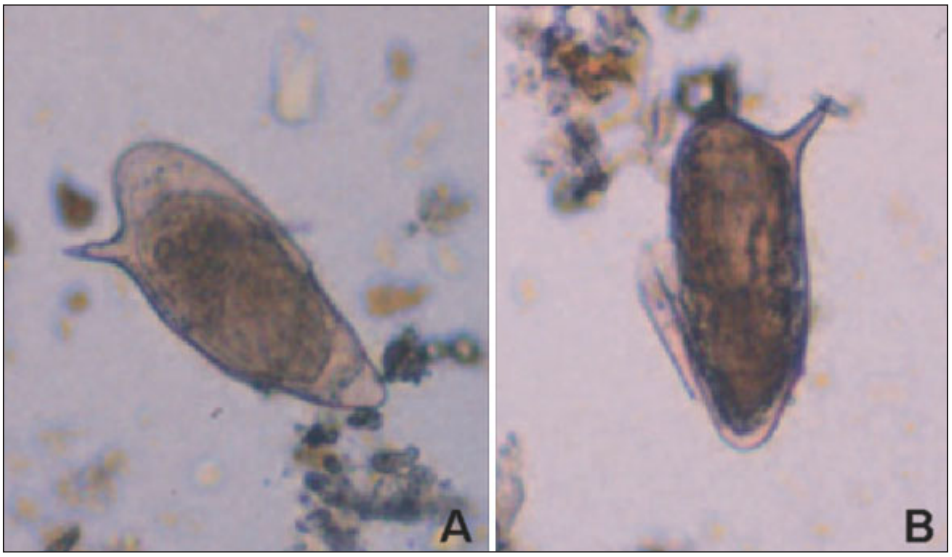


Fig. 38.40 — *A e B = Ovos de* Schistosoma mansoni*. Quando os ovos são excretados contêm o miracídio (visível especialmente em A). (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

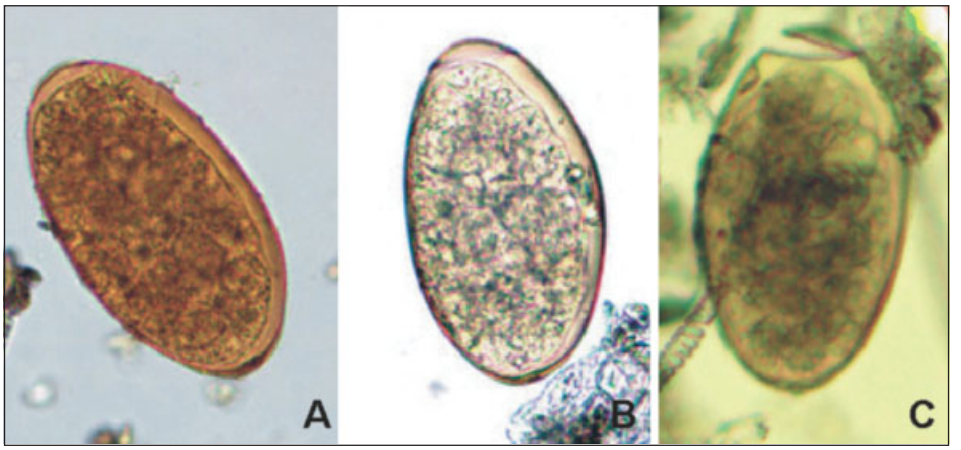


Fig. 38.41 — *A, B e C = Ovos de* Fasciola hepatica*. Exame direto a fresco, ovos corados pela solução de iodo); C = Ovo com o opérculo aberto. (Cortesia — DPDx, the CDC website for parasitology diagnosis, EUA.)*

carneiros e outros mamíferos herbívoros e omnívoros, inclusive o homem. Comprimento de 20-30mm por 13mm de largura. Relativamente achatado e em forma de folha, apresentando na extremidade anterior uma projeção cônica de 4-5mm de comprimento. Tegumento revestido de escamas; faringe musculosa; esôfago curto, continuando por dois cecos bem ramificados. Testículos muito ramificados, situados um atrás do outro, na porção média do corpo; ovário também ramificado, menos do que os testículos e situado à direita da linha mediana, na frente do testículo anterior; bolsa do cirro bem desenvolvida, contendo a vesícula seminal, as glândulas prostáticas e o cirro; átrio genital adiante da ventosa posterior; útero relativamente curto, situado entre ootipo e o átrio genital; vitelária de posição extracecal.

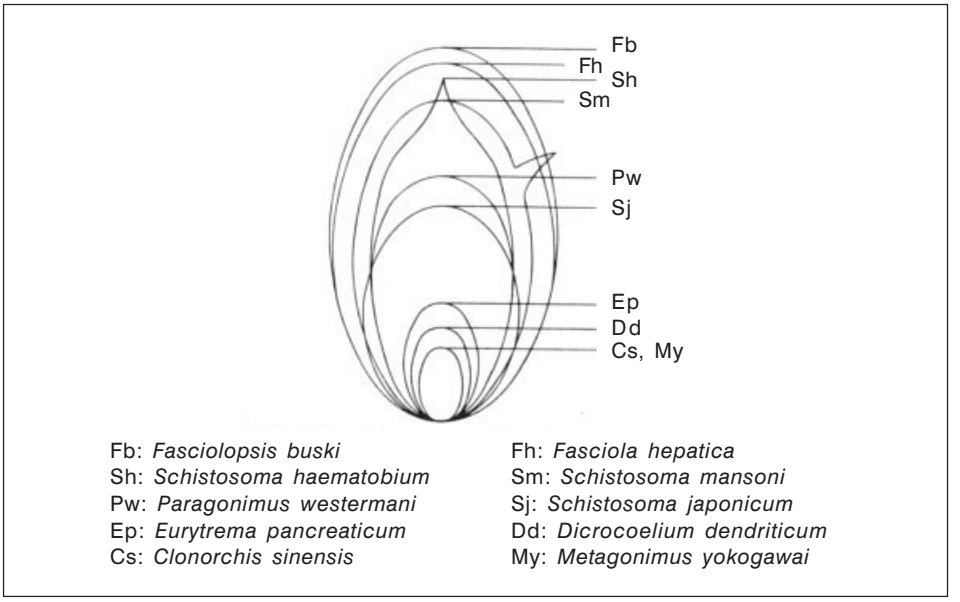


Fig. 38.42 — *Tamanho dos diferentes ovos de trematódeos. (Cortesia de Suzuki, N. Human Helminth Eggs. JAPC e JOICFP: Tokyo; 1981.)*

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Ovos

Os ovos são grandes, de cor pardacento-clara, com opérculo, medindo 130-150μm de comprimento por 63-90μm de largura; ao serem lançados com as fezes do hospedeiro parasito, não apresentam o miracídio, que se desenvolve cerca de 9-15 dias depois dos ovos caírem em água doce a 22°C a 25°C (Fig. 38.41 e 38.42).

PARASITOS HUMANOS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA[4,6] (Tabela 38.5)

Protozoários

Amebas Intestinais

Entamoeba histolytica, Entamoeba dispar, Entamoeba hartmanni, Entamoeba coli, Entamoeba polecki, Endolimax nana, Iodamoeba bütschlii, Blastocystis hominis.

Flagelados Intestinais

Giardia lamblia, Chilomastix mesnili, Dientamoeba fragilis, Trichomonas (Pentatrichomonas) hominis, Enteromonas hominis, Retortamonas intestinalis.

Ciliados Intestinais

Balantidium coli.

Coccídios Intestinais

Cryptosporidium parvum, Cyclospora cayetanensis, Isospora belli, Sarcocystis hominis, Sarcocystis suihominis, Sarcocystis "lindemanni".

Microscoporídios Intestinais

Enterocytozoon bieneusi, Encephalitozoon intestinalis.

Esporozoários e Flagelados do Sangue e dos Tecidos

Esporozoários

Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale, Plasmodium vivax, Babesia microti, Babesia divergens, Babesia bigemina.

Flagelados

Complexo *Leishmania tropica,* Complexo *Leishmania mexicana,* Com-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Tabela 38.5
Parasitos Intestinais: Estágio de Diagnóstico, Forma e Tamanho[3,4]

Espécies	*Estágio de Diagnóstico*	*Forma*	*Tamanho (μm)*
Protozoários			
Entamoeba histolytica	Cisto	Esférico	10-20 (média 12-15)
Entamoeba hartmanni	Cisto	Esférico	5-10 (média 6-8)
Entamoeba coli	Cisto	Esférico	10-35 (média 15-25)
Endolimax nana	Cisto	Esférico	5-10 (média 6-8)
Iodamoeba bütschlii	Cisto	Esférico	5-20 (média 10-12)
Giardia lamblia	Cisto	Elipsóide, esférico ou oval	8-19 x 7-10
Chilomastix mesnili	Cisto	Forma de limão	6-10 x 4-6
Balantidium coli	Cisto	Esférico, oval	50-100 x 40-70
Blastocystis hominis	Forma vacuolizada	Esférico, oval ou elipsóide	4-15 (média 8-10)
Cryptosporidium parvum	Oocisto	Esférico ou oval	3-6 (média 4-5)
Cyclospora cayetanensis	Oocisto	Esférico	8-9 (média 7,7-10)
Isospora belli	Oocisto	Elipsóide	20-30 x 10-19
Sarcocystis	Esporocisto	Ovóide	
S. hominis			13-17 (média 14-16)
S. suihominis			11-15 (média 12-13)
Enterocytozoon bieneusi	Esporo	Esférico ou oval	1-4
Encephalitozoon (Septata) intestinalis	Esporo	Esférico ou oval	0,8 x 1,5
Helmintos			
Ascaris lumbricoides	Ovo (fértil)	Oval	55-75 x 35-50
	Ovo (infértil)	Oval	85-95 x 43-47
Enterobius vermicularis	Ovo	Oval	50-60 x 20-30
Ancilostomídeos	Ovo	Oval	60-75 x 36-40
Necator americanus e *Ancylostoma duodenale*			
Trichostrongylus spp.	Ovo	Oval	75-95 x 40-50
Strongyloides stercoralis	Larva	Rabditóide	180-380 x 14-20
Trichuris trichiura	Ovo	Aspecto típico de barril	50-55 x 20-23
Taenia spp.	Ovo	Esférico	31-43
Taenia saginata e *Taenia solium*			
Hymenolepis nana	Ovo	Esférico	30-47
Hymenolepis diminuta	Ovo	Oval	70-85 x 60-80
Schistosoma mansoni	Ovo	Oval	114-175 x 45-70
Fasciola hepatica	Ovo	Oval	130-150 x 63-90

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

plexo *Leishmania braziliensis*, Complexo *Leishmania donovani*, Complexo *Leishmania major*, Complexo *Leishmania aethiopica*, *Leishmania peruviana*, *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*.

Amebas e Flagelados com Diferentes Localizações no Corpo Humano

Amebas

Naegleria fowleri, *Acanthamoeba* spp., *Hartmanella* spp., *Balamuthia mandrillaris* (leptomyxid ameba), *Entamoeba gingivalis*.

Flagelados

Trichomonas vaginalis, *Trichomonas tenax*.

Coccídios dos Tecidos

Toxoplasma gondii.

Microsporídios dos Tecidos

Encephalitozoon spp., *Encephalitozoon intestinalis*, *Nosema* spp., *Pleistophora* spp., *Vitaforma* spp., *Microsporidium* spp.

NEMATÓIDES

Intestinais

Trichuris trichiura, *Capillaria philippinensis*, *Enterobius vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis*, *Trichostrongylus* spp.

Tecidos

Trichinella spiralis, *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, *Ancylostoma baziliense*, *Ancylostoma caninum*, *Dracunculus medinensis*, *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus costaricensis*, *Anisakis* spp., *Capillaria hepatica*, *Thelazia* spp., *Gnathostoma spinigerum*, *Phocanema* spp., *Contracaecum* spp.

Sangue e Tecidos

Wuchereria bancrofti, *Brugia malayi*, *Brugia timori*, *Loa loa*, *Onchocerca volvulus*, *Mansonella perstans*, *Mansonella ozzardi*, *Mansonella streptocerca*, *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria* spp.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Cestóides

Intestinais

Diphyllobothrium latum., Dipylidium caninum, Hymenolepis nana, Hymenolepis diminuta, Taenia saginata, Taenia solium.

Tecidos (Forma Larval)

Taenia solium, Echinococcus granulosus, Echinococcus multilocularis, Multiceps multiceps, Spirometra mansonoides, Diphyllobothrium spp.

Trematódeos

Intestinais

Fasciolopsis buski, Echinostoma ilocanum, Heterophyes heterophyes, Metagonimus yokogawai, Nanophyetus salmincola.

Fígado e Pulmões

Clonorchis (Opisthorchis) sinensis, Opisthorchis viverrini, Fasciola hepatica, Paragonimus westermani, Paragonimus mexicanus.

Sangue

Schistosoma haematobium, Schistosoma japonicum, Schistosoma mekongi, Schistosoma mansoni, Schistosoma intercalatum.

PARASITOS HUMANOS E SUAS LOCALIZAÇÕES PRIMÁRIAS[4,6] (Tabela 38.5)

Protozoários

Amebas

Entamoeba histolytica (I), *Entamoeba dispar* (I), *Entamoeba hartmanni* (I), *Entamoeba coli* (I), *Endolimax nana* (I), *Iodamoeba bütschlii* (I), *Blastocystis hominis* (I), *Naegleria fowleri* (T, L), *Acanthamoeba* spp. (T, L, O), *Hartmanella* spp. (T, L), *Balamuthia mandrillaris* (T, L), *Entamoeba gingivalis* (B).

Flagelados

Giardia lamblia (I), *Chilomastix mesnili* (I), *Dientamoeba fragilis* (I), *Trichomonas (Pentatrichomonas) hominis* (I), *Enteromonas hominis* (I),

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Retortamonas intestinalis (I), Complexo *Leishmania tropica* (T), Complexo *Leishmania mexicana* (T), Complexo *Leishmania braziliensis* (T), Complexo *Leishmania donovani* (F,T), *Leishmania major* (T), *Leishmania aethiopica* (T), *Leishmania peruviana* (T), *Trypanosoma brucei gambiense* (S, L), *Trypanosoma brucei rhodesiense* (S, L), *Trypanosoma cruzi* (S, T), *Trypanosoma rangeli* (S), *Trichomonas vaginalis* (G), *Trichomonas tenax* (B).

Ciliados

Balantidium coli (I).

Coccídios e Esporozoários

Cryptosporidium parvum (I), *Cyclospora cayetanensis* (I), *Isospora belli* (I), *Sarcocystis hominis* (I), *Sarcocystis suihominis* (I), *Sarcocystis "lindemanni"* (I), *Toxoplasma gondii* (T), *Plasmodium falciparum* (S), *Plasmodium malariae* (S), *Plasmodium ovale* (S), *Plasmodium vivax* (S), *Babesia* spp. (S).

Microsporídios

Encephalitozoon spp. (O, F, T), *Enterocytozoon bieneusi* (I), *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* (I, T), *Nosema* spp. (O), *Pleistophora* spp. (T), *Vitaforma* spp. (O).

Nematóides

Trichuris trichiura (I), *Capillaria philippinensis* (I), *Enterobius vermicularis* (I), *Ascaris lumbricoides* (I), *Ancylostoma duodenale* (I), *Necator americanus* (I), *Strongyloides stercoralis* (I), *Trichostrongylus* spp. (I), *Anisakis* spp. (T), *Capillaria hepatica* (F), *Trichinella spiralis* (T), *Toxocara canis* (T), *Toxocara cati* (T), *Ancylostoma braziliense* (T), *Ancylostoma caninum* (T), *Wuchereria bancrofti* (T, S), *Brugia malayi* (T,S), *Loa loa* (T, S), *Onchocerca volvulus* (T), *Mansonella perstans* (T,S), *Mansonella ozzardi* (T,S), *Mansonella streptocerca* (T), *Dirofilaria immitis* (T) *Dirofilaria* spp. (T), *Dracunculus medinensis* (T), *Angiostrongylus cantonensis* (T), *Angiostrongylus costaricensis* (T), *Thelazia* spp. (T), *Gnathostoma spinigerum* (T), *Phocanema* spp. (T), *Contracaecum* spp. (T).

Cestóides

Diphyllobothrium latum. (I), *Dipylidium caninum* (I), *Hymenolepis nana* (I), *Hymenolepis diminuta* (I), *Taenia saginata* (I), *Taenia solium* (I,T), *Diphyllobothrium* spp. (T), *Echinococcus granulosus* (F), *Echinococcus multilocularis* (F), *Multiceps multiceps* (T), *Spirometra mansonoides* (T).

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

TREMATÓDEOS

Clonorchis (Opisthorchis) sinensis (F), *Fasciola hepatica* (F), *Fasciolopsis buski* (I), *Heterophyes heterophyes* (I), *Metagonimus yokogawai* (I), *Nanophyetus salmincola* (I), *Opisthorchis viverrini* (F), *Paragonimus westermani* (P), *Paragonimus mexicanus* (P) *Schistosoma haematobium* (S), *Schistosoma japonicum* (S), *Schistosoma mekongi* (S), *Schistosoma mansoni* (S), *Schistosoma intercalatum* (S), *Echinostoma ilocanum* (T).

As abreviaturas significam: B = cavidade bucal; F = fígado; G = sistema urogenital; I = intestino; L = líquido cefalorraquidiano; O = olhos; P = pulmões; S = sangue; T = tecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amaral ADF. Manual de Aulas Práticas. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP): Departamento de Parasitologia, 1969.
2. Ash LR, Oriehl TC. Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification. Chicago (Ill): ASCP Press, 1991.
3. Ash LR, Orihel TC. Atlas of Human Parasitology. 4th ed. Chicago: ASCP Press, 1997.
4. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3nd ed. Washington: ASM Press, 1997.
5. Garcia LS. Practical Guide to Diagnostic Parasitology. Washington: ASM Press, 1999.
6. Fritsche TR, Smith JA. Introduction to Diagnostic Parasitology: Biologic, Clinical, and Laboratory Considerations. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA et al, eds. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington: ASM Press, 1995. p.1141-1144.
7. Knell AJ. Malaria. Oxford: Oxford University Press, 1991.
8. Mehlhorn H, ed. Parasitology in focus. Berlin: Springer-Verlag, 1988.
9. Neto Amato V, Campos R. Diagnóstico das Parasitoses Intestinais pelo Exame das Fezes. São Paulo: Livraria Editora Artes Médicas Ltda., 1968.
10. Neves DP, de Melo AL, Genaro O, Linardi PM. Parasitologia Humana. 10a ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2000.
11. Organização Mundial da Saúde. Manual de Diagnóstico da Malária. 4a ed. Publicação Científica N.º 276, Washington: Organização Pan-Americana da Saúde, Repartição Sanitária Pan-Americana, 1975.
12. Pessôa SB, Martins AV. Pessôa Parasitologia Médica. 11a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1982.
13. Procedimentos Laboratoriais em Parasitologia Médica. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1994.
14. Rey L. Parasitologia. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1991.
15. Rey L. Dicionário de termos técnicos de Medicina e Saúde. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999
16 Smith JW, Melvin DM, Orihel TC et al. Blood and Tissue Parasites. Diagnostic Medical Parasitology. Chicago (Ill): ASCP Press, v.1, 1976.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

17. Smith JW, McQuay RM, Ash LR et al. Intestinal Protozoa. Diagnostic Medical Parasitology. Chicago (Ill): ASCP Press, v.2, 1976.

18. Smith JW, Ash LR, Thompson JH et al. Intestinal Helminths. Diagnostic Medical Parasitology. Chicago (Ill): ASCP Press, v.3, 1976.

19. Sun T. Parasitic Disorders. Pathology, Diagnosis and Management. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999.

20. Wilcox A. Manual for the Microscopic Diagnosis of Malaria in Man. Washington: U.S. Department of Health, Education and Welfare Public Helath Service Publication N.º 796: Goverment Printing Office, 1960.

REFERÊNCIAS RECOMENDADAS

1. Bogitsh BJ, Cheng TC. Human Parasitology. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1998.

2. Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D. Parasitology. 9th ed. London: Arnold, v.5, 1998.

3. De Carli GA. Diagnóstico Laboratorial das Parasitoses Humanas. Métodos e Técnicas. Rio de Janeiro: MEDSI, 1994.

4. De Carli GA. Parasitologia Clínica: Diagnóstico de Laboratório dos Coccídios e Microsporídios Intestinias. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2000.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte



SEÇÃO 11

Apêndices

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

APÊNDICE 1



Soluções, Corantes, Reagentes e Fixadores

Geraldo Attilio De Carli

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Neste apêndice serão descritas soluções, corantes, reagentes e fixadores indicados para a realização de diferentes procedimentos no laboratório de Parasitologia. A importância do laboratório em possuir material de referência para estudo deve ser enfatizada, pois esse material não se destina somente para confirmar a identificação realizada de um determinado espécime submetido ao exame, mas para ser usado no treinamento e no controle de qualidade (CQ) do pessoal do laboratório de Parasitologia. Somente material de excelente qualidade deve ser usado para referência e estudo. Ovos, larvas, trofozoítos, cistos, oocistos e esporos devem ser muito bem preservados e quando estiverem disponíveis novos espécimes, estes devem substituir as preparações antigas que podem estar deterioradas e alteradas. Esfregaços fecais e sangüíneos permanentes corados são de grande importância como material de referência. Quando diferentes amostras positivas para parasitos são diagnosticadas no laboratório, todo o material deverá ser preservado, para a preparação de material de referência e para estudo. Uma variedade de procedimentos pode ser usada para a preservação dos parasitos em seus diferentes estágios e para o estabelecimento de uma eficiente coleção.

ANTICOAGULANTES

SOLUÇÃO DE ALSEVER

A solução de Alsever (1941) é um anticoagulante e preser-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

vador isotônico do sangue, que permite o armazenamento do sangue no refrigerador (4°C a 5°C) até dois meses.

Fórmula Atual

Glicose ($C_6H_{12}O_6$)	24,6g
Citrato sódico ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$)	9,6g
Cloreto de sódio (NaCl)	5,4g
Água destilada-deionizada	1.200ml

Fórmula Original

Glicose ($C_6H_{12}O_6$)	20,5g
Citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$)	8g
Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$)	0,55g
Cloreto de sódio (NaCl)	4,2g
Água destilada-deionizada	1.000ml

Preparação

Dissolver os componentes em água destilada-deionizada, filtrar em Seitz ou em Millipore. Estocar a solução anticoagulante no refrigerador à temperatura de 4°C a 5°C, até seis meses.

Como Usar

Partes iguais do anticoagulante e do sangue (v/v).

Soluções Ácido-Citrato-Dextrose (ACD) e Citrato-Fosfato-Dextrose (CPD)

Solução	ACD	CPD
Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$)	8g	3,27g
Citrato de sódio ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$)	22g	26,3g
Glicose ($C_6H_{12}O_6$)	24,5g	25,5g
Diidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4)		2,22g
Água destilada-deionizada	1.000ml	1.000ml

Preparação

Dissolver os componentes em água destilada-deionizada e esterilizar pela filtração em filtro Millipore de 0,45μm de porosidade. Teste de esterilidade em tioglicolato de sódio (18-24 horas-37°C).

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Como Usar

Solução ACD ou CPD	70ml
Sangue total	430ml

Solução de Citrato de Sódio

O citrato de sódio atua como anticoagulante pela formação de um sal insolúvel com o cálcio, elemento necessário para a coagulação. A solução de citrato de sódio (3,8%) é indicada para a estocagem de suspensões de eritrócitos.

Citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$)	3,8g
Solução salina a 0,85%	100ml

Preparação

Dissolver o citrato de sódio na solução salina fisiológica a 0,85%. Autoclavar (15min-121°C).

Como Usar

Sangue total	0,5ml
Solução de citrato de sódio	4,5ml

Solução de Heparina

Fórmula

Heparina	6,4mg
Solução salina a 0,85%	0,25ml

Como Usar

Sangue total	5ml
Solução de heparina	0,25ml

CORANTES

Fucsina-Ácida-Fast-Green (Lawless, 1953)

Fórmula

Acetona (C_3H_6O)	50ml
Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)	50ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Formaldeído 37-40% (HCHO)	10ml
Solução de Schaudinn (ver p. 11)	890ml
Fucsina ácida (CI 42685-Sigma) ($C_{20}H_{17}N_3O_9S_3Na_2$)	2,5g
Fast green FCF (CI 42053-Sigma) ($C_{37}H_{34}N_2O_{10}S_3Na_2$)	1g

Preparação

Misturar os quatro líquidos e adicionar os dois corantes. Agitar vigorosamente até a completa dissolução. Armazenar em frasco âmbar com tampa esmerilhada.

Hematoxilina Ácida de Ehrlich (Gurr, 1956)

Fórmula

Hematoxilina, forma cristalina (CI 75290-Merck) ($C_{16}H_{14}O_6$)	2g
Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)	10ml
Álcool metílico (CH_4O)	100ml
Glicerina ($C_3H_8O_3$)	100ml
Água destilada-deionizada	100ml
Alúmen amoniacal ($NH_4Al(SO_4)_2.12H_2O$)	3g

Preparação

Misturar o ácido acético glacial e 25ml de álcool metílico absoluto. Dissolver a hematoxilina nesta solução e adicionar os restantes 75ml de álcool metílico e a glicerina. Dissolver o sulfato de potássio amoniacal em água destilada quente e misturar as soluções. Deixar esta solução em contato com a luz solar ou a 37°C, durante várias semanas, para que a hematoxilina se oxide à hematina. Quando a solução estiver amadurecida, filtrar em papel-filtro e armazenar em frasco âmbar.

Indicação

Coloração de trematódeos e cestóides.

Corante de Burrow

Fórmula

Tionina (CI 52000) ($C_{12}H_9N_3S.C_2H_4O_2$)	20mg
Álcool etílico absoluto (C_2H_6O)	3ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)	3ml
Água destilada-deionizada	94ml

Uso

Misturar partes iguais de fezes concentradas e do corante. Imergir o esfregaço no corante durante 12 a 18 horas.

Indicação

Coloração temporária para protozoários. Os corpos cromatóides dos cistos dos protozoários intestinais coram-se em azul profundo.

Corante do Alaranjado de Acridina

Solução Estoque

Alaranjado de acridina (CI 46005) ($C_{17}H_{20}ClN_3.1/2ZnCl_2$)	0,1g
Água destilada-deionizada	100ml

Solução de Trabalho

Solução estoque de alaranjado de acridina	1ml
Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)	0,5ml
Solução tampão de fosfato pH 6,8	8,5ml

Uso

Misturar partes iguais de fezes concentradas e do corante. Examinar depois de 30 minutos, sob a ação da luz ultavioleta, o sedimento.

Indicação

Coloração temporária para protozoários. Os corpos cromatóides dos cistos dos protozoários intestinais fluorescem em verde.

Coloração pela Eosina Salina

Fórmula

Eosina B (CI 45400) ($C_{20}H_6N_2O_9Br_2Na_2$)	1,0g
Solução salina fisiológica	100ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Uso

Emulsificar as fezes diretamente na solução de eosina em salina fisiológica pré-aquecida à temperatura de 37°C.

Indicação

Coloração temporária para protozoários. As amebas não coradas são facilmente observadas contra o fundo rosa da preparação. O ectoplasma granulado e grosseiro pode ser diferenciado do ectoplasma claro e não corado.

Corante de Thonson

Fórmula

Solução aquosa a 10% de nigrozina (m/v) (CI 50420)	1 parte
Solução aquosa a 1% de *alcien blue* (m/v) (CI 74240)	1 parte

Uso

Misturar uma gota do sedimento fecal com uma gota do corante de Thonson.

Indicação

O fundo da coloração cora-se em negativo para ovos e cistos.

Corante de Sargeaunt

Verde de malaquita (CI 42000) $[(C_{23}H_{25}N_2)_2.3C_2H_2O_4]$	0,2g
Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)	3ml
Álcool etílico a 95% (v/v) (C_2H_6O)	3ml
Água destilada-deionizada	94ml

Uso

Misturar partes iguais do corante e do sedimento fecal. Deixar em repouso por 12 a 18 horas.

Indicação

Os corpos cromatóides dos cistos dos protozoários intestinais coram-se em verde profundo.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Colorações Temporárias para Protozoários

Solução de Iodo de Lugol (Fórmula Dupla)

a. Solução I

Iodeto de potássio (KI)	20g
Iodo (I_2)	10g
Água destilada-deionizada	100ml

• Dissolver 20g de iodeto de potássio em água. Adicionar lentamente 10g de cristais de iodo e agitar a mistura até a completa dissolução. Filtrar e estocar em frasco de cor âmbar com tampa esmerilhada, ao abrigo da luz. Preparar novas soluções depois de 10 a 14 dias. Indicar a data de validade no rótulo do frasco.

b. Solução II

Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)	25ml
Água destilada-deionizada	75ml

Reativo

Misturar volumes iguais da solução I e II.

Coloração

Colocar uma ou duas gotas da solução em lâmina de microscopia. Remover pequena porção de fezes do recipiente e emulsificar no corante, cobrindo a preparação com lamínula. Nos cistos corretamente corados, o glicogênio exibe uma coloração castanho-avermelhada e os corpos cromatóides coram-se de marrom a preto.

PREPARAÇÕES PERMANENTES PARA OVOS E LARVAS DE HELMINTOS

O desenvolvimento e a preparação de uma coleção de ovos, larvas e parasitos adultos de helmintos para referência e para propósitos de estudo devem seguir procedimentos-padrão no laboratório de diagnóstico. O material fecal positivo para ovos e larvas deve ser concentrado e preservado em solução salina de formaldeído a 5-10%, misturando uma porção de fezes em três volumes de formalina. A morfologia típica dos ovos, quando fixados algumas horas após a passagem, é mantida indefinidamente. As larvas de *Strongyloides stercoralis* são uma exceção, pois a morfologia é mantida

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

por somente um a dois anos, antes do desenvolvimento de uma aparência granular, tornando a morfologia interna de difícil reconhecimento. A oncosfera no centro dos ovos de *Hymenolepis nana* e *Hymenopelis diminuta* depois de vários anos de preservação, se desloca em direção à parede externa, não apresentando a típica aparência dos ovos em fezes frescas. Os ovos do gênero *Taenia* desenvolvem uma aparência granular depois de vários anos de preservação. Os miracídios e os ovos de *Schistosoma mansoni* encolhem e perdem a característica morfologia e aparência depois de vários anos de preservação.

Nematóides: Diferentes fixadores são usados para matar os nematóides adultos e as larvas. A maioria dos fixadores devem ser usados a quente (60-63°C), uma vez que a imersão dos nematóides vivos em fixadores à temperatura ambiente, freqüentemente resulta no enrolamento do parasito, trazendo problemas para a montagem e o estudo morfológico. Os nematóides fixados em fixadores quentes e/ou em ácido acético glacial usualmente permanecem retos; os vivos são transferidos da solução salina para uma placa de Petri funda, com muito pouco líquido. Aquecer o fixador AFA a 60-63°C e derramar rapidamente sobre os nematóides. Deixar o fixador esfriar na própria placa de Petri; os nematóides devem permanecer no fixador por 48 horas e devem ser conservados em etanol a 70%, com ou sem 5-10% de glicerina (Amato, Boeger e Amato, 1991). A solução de formaldeído não é recomendada como fixador, devido a sua lenta penetração e suas propriedades de endurecimento. Os nematóides podem ser mortos pela imersão rápida em água quente (60-63°C), mas devem ser transferidos imediatamente após (rapidamente) para o preservador apropriado, como a solução de álcool glicerinado ou solução de álcool formaldeído-ácido acético (AFA). Os estádios de larva dos nematóides podem ser mortos em água quente, procedimento que apresenta vantagens; a imersão direta em certos fixadores torna a cutícula pegajosa, possibilitando a adesão do espécime às paredes das pequenas placas de Petri. Na prática de laboratório são preferidas as soluções que matam e fixam os organismos, preservando-os por longos períodos. Certos fixadores, como o ácido acético glacial, são excelentes fixadores para matar os vermes, mas inadequados para longos períodos de preservação.

Cestóides: O afrouxamento dos cestóides antes da fixação, usualmente, não é necessário; entretanto, deve ser assegurado que o rostro do escólex de algumas tênias esteja distendido e visível. Os cestóides devem ser comprimidos entre duas lâminas de microscopia, que devem ser amarradas com linha e deixadas em pé em um recipiente com o fixador. O tempo de compressão varia, de dias a meses. A preparação deve ser montada dentro de uma placa de Petri funda, onde o fixador a quente (60-63°C) deve ser colocado. Alternativamente, a tênia pode ser colocada diretamente no fixador a quente, e com uma pinça roda-se rapidamente o verme na placa, fixando-o rapidamente, permitindo assim a mínima contração das proglotes. Os vermes adultos são muito bem fixados em AFA ou em solução tamponada de formaldeído. Os cestóides, conforme alguns autores (Amato, Boeger e Amato, 1991), devem ser mortos sob a ação do frio no refrigerador e em água destilada, para que haja o relaxamento da musculatura. Após a morte, todo o cestóide deve ser comprimido entre lâminas e colocado no fixador frio. Visto que os fixadores ácidos dissolvem os corpúsculos calcários encontrados

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

no parênquima dos tecidos dos cestóides, são recomendados fixadores tamponados ou não possuidores de ácidos na suas fórmulas quando essas estruturas devem ser demonstradas. As tênias são mais bem estudadas quando o escólex e o estróbilo são corados. Os corantes carmim e hematoxilina são empregados para a coloração das proglotes; entretanto, é recomendada, para uma rápida identificação das proglotes que passam junto com as fezes, a injeção de tinta-da-índia e/ou a imersão em metoquina ou a montagem direta das proglotes.

Trematódeos: A maioria dos trematódeos deve ser morta pela simples imersão em fixadores convencionais. Após o afrouxamento, os organismos devem ser fixados a quente (60-63°C) enquanto apresentarem a consistência plana. O fixador a quente deve ser adicionado lentamente sobre o verme. Muita pressão sobre o verme distorce o arranjo interno dos órgãos. AFA é um excelente fixador para trematódeos. Após a fixação, no máximo 48 horas o organismo pode ser armazenado em AFA ou transferido para a solução de álcool etílico a 70%. A solução de formaldeído não é recomendada para fixação dos trematódeos. Muitas colorações são usadas para corar os trematódeos, mas geralmente os corantes usados variam entre o carmim e a hematoxilina.

FIXADORES/PRESERVADORES

Álcool Formaldeído-Ácido Acético (AFA)

Fórmula

Álcool etílico a 70% (C_2H_6O)	93ml
Formaldeído 37-40% (HCHO)	5ml
Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)	2ml

Indicação

Fixação de nematóides, trematódeos, cestóides e acantocéfalos, a frio ou a quente (60-63°C). Os helmintos, depois da fixação em AFA, por várias horas ou durante toda a noite, poderão ser armazenados nessa solução fixadora, mas recomenda-se que sejam transferidos para a solução fixadora de álcool glicerinado. Trematódeos, cestóides e acantocéfalos devem ser mantidos, para uma armazenagem longa, em álcool a 70%.

Álcool Glicerinado

Fórmula

Álcool etílico a 70% (C_2H_6O)	90ml	95ml
Glicerina ($C_3H_8O_3$)	10ml	5ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

ou

Álcool etílico a 70% (C_2H_6O)	70ml
Glicerina ($C_3H_8O_3$)	5ml
Água destilada-deionizada	25ml

Indicação

Esta solução é um excelente fixador e conservador de nematóides. A fixação deverá ser realizada a quente (60°C). A maior vantagem deste fixador é a conservação indefinida destes vermes. A glicerina protege os nematóides da dessecação no caso de evaporação do álcool.

Fixador de Travassos

Fórmula

Solução de Ringer (ver p. 201)	92ml
Formaldeído (HCHO)	5ml
Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)	3ml

Indicação

Esta solução é um excelente fixador e conservador de nematóides. A fixação deverá ser realizada a quente (70-75°C). Transferir os vermes, depois de uma hora, para a solução de álcool etílico a 70%. Conservação indefinida.

Fixador de Blé

Fórmula

Álcool etílico a 70% (C_2H_6O)	90ml
Formaldeído 37-40% (HCHO)	7ml
Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)	3ml

Indicação

Fixação de larvas e adultos de helmintos a quente (70°C).

Líquido de Bouin ou Picroformaldeído

O ácido pícrico foi introduzido na técnica histológica por P. Bouin. O fixador é um excelente coagulante de proteínas e misturado a outros fixadores apresenta uma grande capacidade de penetração.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Solução aquosa saturada de ácido pícrico (~1,5g%) $[C_6H_2(NO_2)_3OH]$	75ml
Formaldeído 37-40% (HCHO)	25ml
Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)	5ml

Preparação

O ácido pícrico cora de amarelo os tecidos. Para melhores resultados, a cor amarela do ácido deverá ser removida antes dos helmintos serem corados. A remoção é realizada através de vários banhos dos espécimes em álcool etílico a 70% a 35-40°C com algumas gotas de solução aquosa de carbonato de lítio ou com uma pitada de hidrogenocarbonato de sódio.

Indicação

Fixação de trematódeos, cestóides e acantocéfalos a frio, durante 6-24 horas.

Fixador de Looss

Fórmula

Álcool etílico a 70% (C_2H_6O)	50ml
Glicerina ($C_3H_8O_3$)	50ml

Indicação

Fixação de nematóides a quente (60°C).

Formaldeído

O formaldeído ou aldeído fórmico (HCHO) é o fixador mais utilizado. Ele reúne as propriedades de um líquido fixador e preservador. Este aldeído é um gás apresentado em solução aquosa e concentração aproximada de 40%, cujo nome comercial é formalina. Sua concentração pode variar de uma amostra para outra, devido à volatilidade e à facilidade à polimerização a paraformaldeído (trioxidometileno) ou à oxidação a ácido fórmico. Um precipitado branco na solução concentrada indica polimerização, diminuindo a concentração. Deve ser protegido da luz e apresenta reação ácida, devido ao ácido fórmico. Na prática este fixador é neutralizado pelo hidróxido de sódio ou pelo carbonato de sódio. O formaldeído possui um grande poder de penetração, os tecidos são fixados e enrijecidos rapidamente, mas não são desidratados, mantendo o seu conteúdo de água; portanto, não são alterados. O formaldeído é um excelente fixador de estruturas topográficas para a caracterização de lipídios sobre corte em congelação e para a pesquisa de substâncias amilóides. Permite também uma pós-fixação. As peças po-

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

dem permanecer longo tempo no fixador sem serem alteradas. O formaldeído não é recomendado para nematóides; entretanto, uma solução diluída de formaldeído a 1-2% é indicada para matar vermes adultos de *Ascaris lumbricoides*. O uso de concentrações altas pode resultar na ruptura do verme, devido a mudanças da pressão osmótica. Evitar inspirar os vapores do formaldeído. Apesar dos autores de diversas técnicas especificarem a sua diluição de formalina, em relação ao conteúdo de formaldeído, a diluição deverá ser feita a partir do formaldeído comercial. Exemplo: para a solução de formaldeído a 10% (v/v) deverão ser usados 10 volumes de formaldeído e 90 volumes de água destilada-deionizada.

Fixador de Gilson

Fórmula

Ácido nítrico (HNO_3)	15ml
Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)	4ml
Cloreto de mercúrio II ($HgCl_2$)	20g
Álcool etílico a 60% (C_2H_6O)	100ml
Água destilada-deionizada	800ml

Indicação

Fixação de trematódeos, cestóides e acantocéfalos a frio ou a quente. Dependendo do tamanho os organismos devem ser fixados de 15 minutos a seis horas.

Fixador de Zenker

Solução Estoque

Sulfato de sódio (Na_2SO_4)	1g
Cloreto de mercúrio ($HgCl_2$)	5g
Bicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$)	2,5g
Água destilada-deionizada	100ml

Fixador

Solução estoque	95ml
Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)	5ml

Preparação

Preparar o fixador imediatamente antes do uso. Usar a solução fixadora somente uma vez, após a adição do ácido acético glacial. Fixação de quatro a 24 horas.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Fixador de Carnoy

Fórmula

Álcool etílico absoluto (100%) (C_2H_6O)	60ml
Clorofórmio ($CHCl_3$)	30ml
Ácido acético ($C_2H_4O_2$)	10ml

Preparação

Misturar em um *beaker* os reagentes. Filtrar e estocar no refrigerador em frasco âmbar de vidro com tampa esmerilhada.

Fixador de Hollande

Fórmula

Ácido pícrico ($C_6H_2(NO_2)_3OH$)	4g
Acetato de cobre ($Cu(C_2H_3O_2)_2.H_2O$)	2,5g
Formaldeído a 37-40% (HCHO)	10ml
Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)	1,5ml
Água destilada-deionizada	100ml

Preparação

Misturar em um *beaker* os reagentes. Filtrar e estocar no refrigerador em frasco de vidro âmbar com tampa esmerilhada.

Solução de Bayer

Solução Estoque

Cloreto de cobre ($CuCl_2$)	7g
Solução a 20% de formaldeído (HCHO) (v/v)	1.000ml
Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)	70ml

Solução de Trabalho e Indicação

No momento do uso diluir uma parte da solução estoque para 10 partes de água destilada-deionizada. Misturar partes iguais das fezes e da solução de Bayer. Preservação indicada para cistos de protozoários intestinais.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

MEIOS DE MONTAGEM

GELATINA GLICERINADA

Fórmula

Gelatina granulada (Difco)	10g
Glicerina ($C_3H_8O_3$)	70ml
Fenol, fundido a 44°C (C_6H_6O)	0,5ml
Água destilada-deionizada	60ml

Preparação

Dissolver 10g de gelatina em 60ml de água destilada-deionizada, em calor moderado. Adicionar 70ml de glicerina e 0,5ml de fenol fundido. Misturar. Estocar no refrigerador em frasco âmbar com tampa de rosca. Na hora de usar aquecer a gelatina de glicerina em banho de água.

MEIO DE HOYER

Fórmula

Goma arábica	30g
Glicerina ($C_3H_8O_3$)	20ml
Hidrato de cloral ($C_2H_3Cl_3O_2$)	200g
Água destilada-deionizada	50ml

Preparação

Misturar 30g de goma arábica em 50ml de água destilada-deionizada e 200g de hidrato de cloral. Agitar até a completa dissolução. Antes do uso filtrar a solução através de gaze dobrada oito vezes. Estocar no refrigerador em frasco âmbar com tampa de rosca.

MEIO DE MONTAGEM DE GREY E WESS

Fórmula

Álcool polivinílico (APV), pó	2g
Acetona a 70% (C_3H_6O)	7ml
Glicerina ($C_3H_8O_3$)	5ml
Ácido láctico ($C_3H_6O_3$)	5ml
Água destilada-deionizada	10ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Preparação

Misturar em um *beaker* os componentes líquidos. Adicionar lentamente, sem agitação, o pó APV. Agitar até a completa dissolução. Se a solução ficar opaca, colocar em banho de água durante 10 minutos, para que ela fique transparente.

SOLUÇÕES SALINAS BALANCEADAS

Soluções de Hanks (HBSS) e Earle (EBSS)

	HBSS	EBSS
Cloreto de sódio (NaCl)	8g	6,80g
Cloreto de potássio (KCl)	0,40g	0,40g
Cloreto de cálcio ($CaCl_2$)	0,14g	0,20g
Sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$)	0,20g	0,20g
Hidrogenofosfato dissódico ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	0,12g	
Diidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4)		0,12g
Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)	0,06g	
Hidrogenocarbonato de sódio ($NaHCO_3$)	0,25[a]g	2,20[b]g
Dextrose (Glicose) ($C_6H_{12}O_6$)	1g	1g
Vermelho de fenol 1% ($C_{19}H_{13}O_5SNa$)	1,60ml[c]	1,60ml
Água destilada-deionizada	1.000ml	1.000ml

[a]Preparar uma solução estoque a 2,8% e adicionar no momento do uso.

[b]Preparar uma solução estoque a 8,8% e adicionar no momento do uso.

[c]Se a cor vermelha ficar muito fraca, adicionar 2ml de solução aquosa de vermelho de fenol a 1%.

Solução A

Diluir o vermelho de fenol em 100ml de água destilada-deionizada.

Solução B

Diluir o cloreto de sódio, o cloreto de potássio, o sulfato de magnésio, os fosfatos dissódico, potássico, hidrogenocarbonato de sódio e a dextrose em 800ml de água destilada-deionizada.

Solução C

Diluir o cloreto de cálcio em 100ml de água destilada-deionizada.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Soluções HBSS e EBSS

Misturar as Soluções A + B + C, esterilizar por filtração em Seitz ou em Millipore e estocar à temperatura de 4-5º C.

SOLUÇÕES TAMPONADAS

Para facilitar a preparação das soluções tamponadas, são apresentadas abaixo a massa molecular dos componentes das soluções mais usadas no laboratório de Parasitologia.

Massa Molecular

Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)	60,05
Ácido bórico (H_3BO_3)	61,83
Ácido cítrico anidro [$C_3H_4(OH)(COOH)_3$]	192,12
Ácido cítrico, cristais [$C_3H_4(OH)(COOH)_3.H_2O$]	210,14
Ácido clorídrico (HCl)	36,465
Ácido sulfúrico (H_2SO_4)	98,082
Acetato de sódio (CH_3COONa)	82,04
Acetato de sódio, cristais (CH_3COONa)	136,09
Ácido fórmico (HCO_2H)	46,03
Barbital sódico ($C_8H_{11}O_3N_2Na$)	206,18
Carbonato de sódio ($NaCO_3$)	106,00
Cloreto de sódio (NaCl)	58,45
Citrato de sódio, cristais [$C_3H_4OH(COONa)_3.5H_2O$]	348,17
Citrato de sódio, cristais [$C_3H_4OH(COONa)_3.5½H_2O$]	357,18
Citrato de sódio, granulado ($C_3H_4OH(COONa)_3.2H_2O$)	294,12
Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)	136,07
Diidrogenofosfato de sódio ($NaH_2PO_4.H_2O$)	138,01
Hidrogenofosfato dissódico ($Na_2HPO_4.7H_2O$)	268,14
Hidrogenofosfato dissódio anidro (Na_2HPO_4)	141,98
Hidrogenocarbonato de sódio ($NaHCO_3$)	84,02
Hidróxido de sódio (NaOH)	40,005
Tetraborato de sódio (bórax) ($Na_2B_4O_7.10H_2O$)	381,43

Solução Molar (M)

Ácido Clorídrico (HCl)

Concentração:	37-38%
Densidade:	1,19g/ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

a. Solução três molar (3M)

HCl concentrado	250ml
Água destilada-deionizada q.s.p.	1.000ml

b. Solução dois molar (2M)

HCl concentrado	170ml
Água destilada-deionizada q.s.p	1.000 ml

c. Solução um molar (1M)

HCl concentrado	85ml
Água destilada-deionizada q.s.p.	1.000ml

Hidróxido de Sódio (NaOH)

a. Solução três molar (3M)

NaOH	120g
Água destilada-deionizada q.s.p.	1.000ml

b. Solução dois molar (2M)

NaOH	80g
Água destilada-deionizada q.s.p.	1.000ml

c. Solução um molar (1M)

NaOH	40g
Água destilada-deionizada q.s.p.	1.000ml

Solução Tampão de Fosfatos (Sörensen)

Preparação das Soluções Estoques

a. Solução I (Hidrogenofosfato de Sódio 15M)

Hidrogenofosfato de sódio (Na_2HPO_4)	11,876g
Água destilada-deionizada	1.000ml

b. Solução II (Diidrogenofosfato de Potássio 15M)

Diidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)	9,079g
Água destilada-deionizada	1.000ml

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Solução Tampão de Sörensen

Para obter o pH específico misturar as quantidades indicadas de Soluções I e II M/15

pH	*Solução I* Na_2HPO_4 *M/15*	*Solução II* KH_2PO_4 *M/15*
5,906	1ml	9ml
6,239	2ml	8ml
6,468	3ml	7ml
6,643	4ml	6ml
6,813	5ml	5ml
6,979	6ml	4ml
7,168	7ml	3ml
7,318	8ml	2ml
7,731	9ml	1ml

Solução Tampão de Fosfatos 0,2M

Preparação das Soluções Estoques

a. Solução I (Diidrogenofosfato de sódio 0,2M)

Diidrogenofosfato de sódio ($NaH_2PO_4.H_2O$)	27,6g
Água destilada-deionizada	1.000ml

b. Solução II (Hidrogenofosfato de sódio 0,2M)

Hidrogenofosfato de sódio ($Na_2HPO_4.7H_2O$)	53,6g
Água destilada-deionizada	1.000ml

c. Solução Tampão

Para obter o pH específico misturar as quantidades indicadas de soluções I e II 0,2M:

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

pH desejado	*Solução I* $NaH_2PO_4.H_2O$ *0,2M*	*Solução II* $Na_2HPO_4.7H_2O$ *0,2M*
5,9	90ml	10ml
6,1	85ml	15ml
6,3	77ml	23ml
6,5	68ml	32ml
6,7	57ml	43ml
6,9	45ml	55ml
7,1	33ml	67ml
7,3	23ml	77ml
7,4	19ml	81ml
7,5	16ml	84ml
7,7	10ml	90ml

Tampão PBS (Phosphate Buffer Solution), pH 7,2

a. Solução Estoque 10X Concentrada

Hidrogenofosfato dissódico (Na_2HPO_4)	20,4g
Diidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4)	7,7g
Cloreto de sódio (NaCl)	175,5g
Água destilada-deionizada (MQP) q.s.p.	1.000ml

b. Solução de Trabalho

Solução estoque	50ml
Água destilada-deionizada (MQP)	950ml

Solução para Limpeza de Vidraria

Solução Sulfocrômica

Uso Geral

Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)	1.000ml
Solução aquosa saturada de bicromato de sódio ($Na_2Cr_2O_7.2H_2O$)	35ml

Preparação

Acrescentar o ácido sulfúrico sobre a solução aquosa saturada de bicromato de sódio.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Para Limpeza de Lâminas

Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)	50ml
Bicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$)	50g
Água corrente	500ml

Uso

Esta solução é recomendada para limpar lâminas de microscopia. Deixar as lâminas mergulhadas na solução de limpeza durante 24 horas, após, lavar em água corrente para remover os resíduos da solução sulfocrômica, enxaguar em água destilada e em solução de álcool etílico a 95%. Deixar secar à temperatura ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Amato Neto V, Campos R. Diagnóstico das Parasitoses Intestinais pelo Exame das Fezes. 3a ed. São Paulo: Artes Médicas, 1968.
2. Amato Neto V, Corrêa LL. Exame Parasitológico das Fezes. São Paulo, SP: Sarvier, 1990.
3. Ash LR, Orihel TC. Parasites. A Guide to Laboratory Procedures and Identification. Chicago (Ill): ASCP Press, 1991.
4. Burrows RB. Microscopic Diagnosis of the Parasites of Man. New Haven: Yale University Press, 1965.
5. De Carli GA. Diagnóstico Laboratorial das Parasitoses Humanas. Métodos e Técnicas. Rio de Janeiro: MEDSI, 1994.
6. De Carli GA. Parasitologia Clínica: Diagnóstico de Laboratório dos Coccídios e Microsporídios Intestinias. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2000.
7. Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic Medical Parasitology. 3nd ed. Washington, DC: ASM Press, 1997.
8. Garcia LS. Practical Guide to Diagnostic Parasitology. Washington, DC: ASM Press, 1999.
9. Gillespie SH, Hawkey PM, eds. Medical Parasitology. A Pratical Approach. Oxford, England: IRL Press, 1995.
10. Technical Manual. Laboratory Procedures in Parasitology. N.º s-227-2. Washington (DC): Headquarters, Department of the Army, 1947.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

APÊNDICE 2



Livros, Atlas, *Abstracts* e Periódicos

Geraldo Attilio De Carli

PARASITOLOGIA GERAL, PARASITOLOGIA CLÍNICA E MEDICINA TROPICAL

LIVROS

Acha PN, Szyfres D. **Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals**. Scientific Publication n.º 354. Washington: Pan American Health Organization, WHO, 1980.

Adam ARD, Maegraith BG. **Clinical Tropical Diseases.** 7th ed. Oxford, England: Blackwell Scientific Publications Ltda., 1980

Adam KMG, Paul J. Zaman. **Medical and Veterinary Parasitology. An Illustrated Guide**. Edinburg: Churchill Livingstone, 1971.

Advisory Committee on Dangerous Pathogens, Health and Safety Executive. **LAV/HTLV — The Causative Agents of AIDS and Related Conditions — Revised Guidelines**. London: HMSO, 1986.

Amato Neto V, Campos R. **Diagnóstico das Parasitoses Intestinais pelo Exame das Fezes**. 3ª ed. São Paulo: Artes Médicas, 1968.

Amato Neto V, Corrêa LL. **Exame Parasitológico das Fezes**. São Paulo: Sarvier, 1990.

© *Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.*

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Ash LR, Orihel TC. **Parasites: A Guide to Laboratory Procedures and Identification**. Chicago (Ill): ASCP Press, 1991.

Association Française des Professeurs de Parasitologie. **Parasitologie-Mycologie**. Paris: Editions C et R, 1991.

Atias A, Neghme A. **Parasitologia Clínica.** 2ª ed. Santiago, Chile: Publicaciones Tecnicas Mediterraneo, 1979.

Atias A, ed. **Parasitologia Clínica**. 3ª ed. Santiago, Chile: Publicaciones Tecnicas Mediterraneo, 1995.

Balows A, ed. **Manual of Clinical Microbiology**. 5th ed. Washington: ASM Press, 1991.

Baker JR, Muller R, Rollinson D, eds. **Advances in Parasitology. Opportunistic Protozoa in Humans**. San Diego: Academic Press, 1998. v.40.

Barret J. **Biochemistry of Parasitic Helmints**. Baltimore: University Park Press, 1981.

Barriga OO. **The Immunology of Parasitic Infections. A Handbook for Physicians, Veterinarians, and Biologists**. Baltimore: University Park Press, 1981.

Beaty BJ, Marquardt WC, eds. **The Biology of Disease Vectors**. Niwot: University Press of Colorado, 1996.

Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. **Clinical Parasitology**. 9th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1984.

Beaver PC, Jung RC. **Animal Agents and Vectors of Human Disease**. 5th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1985.

Beck JW, Barrett-Connor E. **Medical Parasitology**. Saint Louis: CV Mosby Co., 1971.

Benex J. **Diagnostic Immunologique des Parasitoses à Protozoaires et Helminthes**. Paris: Maloine SA Editeur, 1974.

Binford CH, Connor DH. **Pathology of Tropical and Extraordinary Diseases**: An Atlas. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1976. v.1 e 2.

Bogitsh BJ, Cheng TC. **Human Parasitology**. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1998.

Brandt H, Tamayo RP. **Amibiasis**. Mexico: La Prensa Médica Mexicana, 1970.

Brener Z, Andrade ZA, eds. ***Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1979.

Bruce-Chwatt LJ. **Essential Malariology**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1985.

Brumpt E. **Précis de Parasitology**. 6th ed. Paris: Masson et Cie Éditeurs, 1949. 2v.

Brumpt E, Neveu-Lemaire M. **Travaux Pratiques de Parasitologie**. Paris: Masson et Cie Éditeurs, 1958.

Burrows RB. **Microscopic Diagnosis of the Parasites of Man**. New Haven: Yale University Press, 1965.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Cable RM. **An Illustrated Laboratory Manual of Parasitology**. 4th ed. Burgess Publishing Co.: Minneapolis, 1958.

Cheesbrough M. **Medical Laboratory Manual for Tropical Countries**. 2nd ed. Cambridge, England: ELPBS, 1992. v.1.

Cheng TC. **General Parasitology**. 2nd ed. Orlando: Academic Press Inc., 1986.

Cimerman B, Cimerman S. **Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais**. São Paulo: Atheneu, 1999.

Coatney GR, Collins WE, Warren M et al. **The Primate Malaria**. US Department of Health, Education, and Welfare: Bethesda (MD), 1971.

Cook GC, ed. **Manson's Tropical Diseases**. 20th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1996.

Coombs I, Crompton DWT. **A Guide to Human Helminths**. London, England: Taylor & Francis, 1990.

Cox FEG, ed. **Modern Parasitology: A Text of Parasitology**. Oxford, England: Blackwell Scientific Publications Ltda., 1982.

Cox FEG, Kreier JP, Wakelim D, eds. ***Topley & Wilson's*. Microbiology and Microbial Infections — Parasitology**. 9th ed. London: Arnold, 1998. v.5.

Da Cunha AS. **Esquistossomose mansoni**. São Paulo: Savier, 1970.

De Carli GA. **Diagnóstico Laboratorial das Parasitoses Humanas. Métodos e Técnicas**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1994.

De Carli GA. **Parasitologia Clínica: Diagnóstico de Laboratório dos Coccídios e Microsporídios Intestinais**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2000.

De Castro LP, da Cunha AS, De Resende JM. **Protozooses Humanas**. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 1994.

Department of Health and Social Security. **Code of Practice for the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Post-mortem Rooms**. London: HMSO, 1878.

Despommier DD, Gwadz RW, Hotez PJ. **Parasitic Diseases**. 3rd ed. New York: Springer-Verlag, 1995.

Desowitz RS. **Ova and Parasites**. Hagerstown, Maryland: Harper and Row, 1980.

Dobell C, O'Connor. **The Intestinal Protozoa of Man**. London: John Bale Sons & Danielsson Ltd., 1921.

Dubey JP, Speer CA, Fayer R. **Cryptosporidiosis of Man and Animals**. Boca Raton: CRC Press, 1990.

Duncan BB, Schmidt MI, Giugliani ERJ. **Medicina Ambulatorial. Condutas Clínicas em Atenção Primária**. 2ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996.

Erlandsen SL, Meyer E, eds. ***Giardia* and Giardiasis, Biology, Pathogenesism and Epidemiology**. New York: Plenum Press, 1984.

Faust EC. **Human Helmithology**. 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1949.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Faust EC, Russell PF. **Craig and Faust's Clinical Parasitology**. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1964.

Faust EC, Beaver CP, Jung RC. **Animal Agents and Vectors of Human Disease**. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1975.

Fayer R. ***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis**. Boca Raton: CRC Press, 1997.

Ferreira AW, Ávila SLM. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996.

Fleck SL, Moody AH. **Diagnostic Techniques in Medical Parasitology**. 11th ed. London: ELBS. 1988.

Garcia LS, Ash LR. **Diagnostic Parasitology. Clinical Laboratory Manual**. St. Louis: CV Mosby Co., 1975.

Garcia LS, **Diagnostic Parasitology.** 4th ed. Washington: ASM Press, 2001.

Garcia LS, Bruckner DA. **Diagnostic Medical Parasitology**. New York: Elsevier, 1989.

Garcia LS, Bruckner DA. **Diagnostic Medical Parasitology**. 2nd ed. New York: Elsevier, 1993.

Garcia LS, Bruckner DA. **Diagnostic Medical Parasitology**. 3rd ed. Washington: ASM Press, 1997.

Garcia LS. **Practical Guide to Diagnostic Parasitology**. Washington: ASM Press, 1999.

Gillespie SH, Hawkey PM, eds. **Medical Parasitology. A Pratical Approach**. Oxford: IRL Press, 1995.

Golvan YJ, Drouhet E. **Techniques en Parasitologie et en Mycologie**. Paris: Flammarion Médicine-Sciences, 1972.

Golvan YJ, Ambroise-Thomas P. **Les Nouvelles Techniques en Parasitologie et Immuno-Parasitologie**. Paris: Flammarion Médicine-Sciences, 1984.

Gray P. Microtomist's Formulary and Guide. New York: Blakiston Co. Inc., 1975.

Guichon A, Inzana TJ, Scimeca JM et al. **Laboratory Diagnosis of Zoonotic Infections: Chlamydial, Fungal, Viral, and Parasitic Infections Obtained from Companion and Laboratory Animals.** Washington: ASM Press, 1996.

Gutierrez Y. **Diagnostic Pathology of Parasitic Infections with Clinical Correlations**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990.

Hausmann K, Hülsmann N. **Protozoology**. New York: Thiene Medical Publishers Inc., 1996.

Hayunga EG, Stek M, eds. **Nuclear and Related Techniques in Parasitology**. Viena: International Atomic Energy Agency, 1986.

Healy GR, Kagan IG, Melvin DM. **Parasitic infections**. Washington: Department of Health, Education, and Welfare, 1970.

© *Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.*

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Henry JB, ed. **Todd-Stanford-Davidsohn. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 17th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1984.

Howell MJ, ed. **Parasitology — Quo vadit**. Camberra: Australian Academy of Science, 1986.

Isenberg HD, ed. **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. Washington: ASM Press, 1992. v.2.

Ishikura H, Kikuchi K, eds. **Intestinal Anisakiasis in Japan. Infected Fish, Sero-Immunological Diagnosis, and Prevention**. Tokyo: Spring-Verlag, 1990.

Honigberg BM, ed. **Trichomonas Parasitic in Humans**. New York: Springer-Verlag, 1989.

Humason GL. **Techniques Tissue Techniques**. San Francisco: WH Freeman & Co., 1972.

Knell AJ. Malaria. **Oxford: Oxford University Press, 1991.**

Kreier JP, ed. **Parasitic Protozoa**. San Diego: Academic Press Inc., 1979. v.I-IV.

Kreier JP, Baker JR, eds. **Parasitic Protozoa**. 2nd ed. San Diego: Academic Press Inc., 1991-1993. v.1-3.

Kreier JP, ed. **Parasitic Protozoa**. 2nd ed. San Diego: Academic Press Inc., 1993-1994. v.4-9.

Kunii C. **It All Started from Worms**. Tokyo: The Koken Kaikan Foundation, 1992.

Langeron M. **Précis de Microscopie**. Paris: Masson et Cie. Éditeurs Libraires de L'Académie de Médicine; 1949.

Larsh J. **Outline of Medical Parasitology**. New York: McGraw-Hill Book Co., 1964.

Lennette EH, Spaulding EH, Truant JP. **Manual of Clinical Microbiology**. 2nd ed. Washington: ASM Press, 1991.

Leventhal R, Cheadle R. **Medical Parasitology. A Self-Instructional Text**. Philadelphia: F.A. Davis Co., 1996.

Levine ND. **Protozoan Parasites of Domestic Animals and Man**. 2nd ed. Minneapolis: Burgess Publishing Co., 1973.

Levine ND. **Nematode Parasites of Domestic Animals and Man**. 2nd ed. Minneapolis: Burgess Publishing Co., 1980.

Lombardero OJ. **Glosario de Terminos Parasitologicos**. Buenos Aires: Eudeba Editorial, 1971.

Luna LG. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Patgology**. 3nd ed. New York: McGraw-Hill Book Co.,1968.

Maldonado JF. **Helmintiasis del Hombre en America**. Barcelona: Editorial Cientifico-Medica, 1965.

Manson-Bahr PEC, Apted FIC. **Manson's Tropical Disease**. 19th ed. London: Bailliere-Tindall, 1987.

© *Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.*

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Markell E, John DT, Krotoski WA. **Markell and Voge's Medical Parasitology**, 8th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1999.

Markell E, Voge M, John DP. **Medical Parasitology**. 7th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1992.

Markell E, Voge M, John DP. **Medical Parasitology**, 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1986.

Martinez AJ. **Free-Living Amebas: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology, and Treatment of Disease**. Boca Raton: CRC Press, 1985.

McAdam KPWJ, ed. New Strategies in Parasitology. Edinburg: Churchill Livingstone, 1989.

Mehlhorn H, ed. **Parasitology in Focus. Facts and Trends**. Berlin: Spring-Verlag, 1988.

Melvin DM, Brooke MM. **Laboratory Procedures for the Diagnosis of Intestinal Parasites**. 3rd ed. HHS publication N.° (CDC) 82-8282. Atlanta: Laboratory Training and Consultation Division, Centers for Disease Control, 1982.

Moura RADA. **Colheita de Material para Exames de Laboratório. Assegurando a Qualidade dos Serviços no Laboratório Clínico**. São Paulo: Atheneu, 1998.

Muller R. **Worms and Disease: A Manual of Medical Helminthology**. London: William Heinemann Medical Books Ltda., 1975.

Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA et al., eds. **Manual of Clinical Microbiolody**. 6th ed, Washington: ASM Press, 1995.

Neva FA, Brown HW. **Basic Clinical Parasitology**. 6th ed. New Jersey: Prentice Hall International Editions, 1994.

Neves DP, de Melo AL, Genaro O, Linardi PM. **Parasitologia Humana**. 10ª ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

Nezelof C, Galle P, Hinglais N. **Techniques Microscopiques**. Paris: Flammarion Médicine-Sciences, 1972.

Nobel ER, Nobel GA. **Parasitology: The Biology of Animal Parasites**. 5th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1982.

Organização Mundial da Saúde. **Manual de Diagnóstico Microscópico da Malária**. Publicação Científica n.º 246, 4a ed. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde, 1975.

Organização Mundial da Saúde. **Procedimentos Laboratoriais em Parasitologia Médica**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1994.

Orihel TC, Ash LR. **Parasites in Human Tissues**. Chicago (Ill): ASCP Press, 1995.

Orihel TC, Ash LR, Ramachandran CP. **Bench Aids for the Diagnosis of Filarial Infections**. Geneva: World Health Organization, 1996.

Pessôa BS, Martins AV. **Pessôa Parasitologia Médica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1982.

Price DL. **Procedure Manual for Diagnosis of Intestinal Parasites**. Boca Raton: CRC Press, 1993.

© *Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.*

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Radvin JI. **Amebiasis Human Infection by Entamoeba histolytica**. New York: John Wiley & Sons, 1988.

Raphael SS. **Lynch' Medical Laboratory Technology**. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1983

Rey L. **Parasitologia**. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1991.

Rey L. **Bases da Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1992.

Rey L. **Dicionário de Termos Técnicos de Medicina e Saúde**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999

Ristic M. **Babesiosis of Domestic Animals and Man**. Boca Raton: CRC Press, 1988.

Schell SC. **Parasitology Laboratory Manual**. New York: John Wiley & Sons, 1962.

Schmidt GD, Roberts LS. **Foundations of Parasitology**. 3rd ed. St. Louis: C.V. Mosby Co., 1985.

Sloss MW. **Veterinary Clinical Parasitology**. 4th ed. Ames: Iowa State University Press, 1976.

Smith JW, Melvin DM, Orihel TC et al. **Blood and Tissue Parasites. Diagnostic Medical Parasitology**. Chicago, Ill: ASCP Press, 1976. v.1.

Smith JW, McQuay RM, Ash LR et al. **Intestinal Protozoa. Diagnostic Medical Parasitology**. Chicago, Ill: ASCP Press, 1976. v.2.

Smith JW, Ash LR, Thompson JH et al. **Intestinal Helminths. Diagnostic Medical Parasitology**. Chicago, Ill: ASCP Press, 1976. v.3.

Smith JW, Fritsche TR. **Selection and Use of Laboratory Produres for Diagnosis of Parasitic Infections of the Gastrointestinal Tract**. Washington: ASM Press, 1996.

Steele JH, ed. **CRC Handbook Series in Zoonoses. Section C. Parasitic Zoonoses**. Boca Raton: CRC Press, 1981. v.1-3.

Strickland GT, ed. **Hunters Tropical Medicine**. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders Co., 1984.

Sun T. **Parasitic Disorders. Pathology, Diagnosis and Management**. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999.

Taylor AER, Baker JR. **The Cultivation of Parasites *in vitro***. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1968.

Taylor ERA, Baker JR, ed. ***In vitro* Methods for Parasite Cultivation**. London: Academic Press Inc., 1987.

Technical Manual. **Laboratory procedures in parasitology**. N.º s-227-2. Washington: Headquarters, Department of the Army, 1947.

Ubelaker JE, Stedman's ASP **Parasite Names**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993.

Vallada EP. **Manual de Coprocultura. Cultura de Fezes. Isolamento, Identificação Bacteriana.** 2nd ed. São Paulo: Atheneu, 1993.

Vallada EP. **Manual de Exames de Fezes. Coprologia e Parasitologia.** São Paulo: Atheneu, 1995.

© *Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.*

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Veronesi R, Focaccia R, eds. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996.

Warren KS, Mahmoud AAF. **Tropical and Geographical Medicine**. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Information Service Co., 1990.

Warren KS, ed. Imunology and Molecular Biology of Parasitic Infections. 3rd ed. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1993.

Wilcox A. **Manual for the Microscopic Diagnosis of Malaria in Man.** Washington: U.S. Department of Health, Education and Welfare Public Health Service Publication N.° 796; Government Printing Office, 1960.

Wittner M, ed. **The Microsporidia and Microsporidiosis**. Washington: ASM Press, 1999.

World Health Organization. **The *In vitro* Culture of Parasites**. World Health Organization: Geneva, Tropical Diseases Research Series, 1979.

World Health Organization. **Bench Aids for the Diagnosis of Malaria. Set Number 1, Plates 1-4**. World Health Organization: Geneva, 1984.

World Health Organization. **Bench Aids for the Diagnosis of Malaria. Set Number 2, Plates 5-8**. World Health Organization: Geneva, 1985.

World Health Organization. **Bench Aids for the Diagnosis of Intestinal Parasites**. World Health Organization: Geneva, 1994.

Yoshida Y. **Bibliography of *Pneumocystis carinii* Pneumonia-Including AIDS.** Tokyo: Nanzando Co. Ltda., 1985.

Young LS, ed. ***Pneumocystis carinii*. Pathogenesis, Diagnosis, Treatment**. New York: Marcel Dekker Inc., 1984.

Zeibig EA. **Clinical Parasitology**. **A practical Approach**. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1997.

Atlas

Ash LR, Orieh TC. **Atlas of Human Parasitology**. 3th ed. Chicago (Ill): ASCP Press, 1990.

Ash LR, Orieh TC. **Atlas of Human Parasitology**. 4th ed. Chicago (Ill): ASCP Press, 1997.

Ash LR, Orieh TC, Savioloi I. **Bench Aids for the Diagnosis of Intestinal Parasites**. Geneva: World Health Organization, 1994.

Chaia G. **Atlas de Parasitologia**. São Paulo: Johnson & Johnson, 1975.

Cimerman B, Franco MA. **Atlas de Parasitologia. Atrópodes, Protozoários e Helmintos**. São Paulo: Atheneu, 1999.

Jeffrey HC, Leach RM. **Atlas of Medical Helminthology and Protozoology**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1991.

Peters W, Gilles HM. **Color Atlas of Tropical Medicine and Parasitology**. Chicago: Year Book Medical, 1977.

Peters W, Gilles HM. **Color Atlas of Tropical Medicine and Parasitology**. 4th ed. London, England: Mosby-Wolfe, 1995.

Salfelder K. **Atlas of Parasitic Pathology**. London: Kluwer Academic Publishers, 1992.

© *Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.*

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Smith JW, Melvin DM, Orihel TC et al. **Blood and Tissue Parasites. Diagnostic Medical Parasitology**. Chicago, Ill: ASCP Press, 1976. v.1.

Smith JW, McQuay RM, Ash LR et al. **Intestinal Protozoa. Diagnostic Medical Parasitology**. Chicago, Ill: ASCP Press, 1976. v.2.

Smith JW, Ash LR, Thompson JH et al. **Intestinal Helminths. Diagnostic Medical Parasitology**. Chicago, Ill: ASCP Press, 1976. v.3.

Spencer FM, Monroe L. **The Color Atlas of Intestinal Parasites**. 3rd ed. Springfield, Ill: Charles C. Thomas-Publisher, 1968.

Sum T. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Parasitology**. New York: Masson, 1988.

Suzuki N. **Color Atlas Human Helminth Eggs**. Tokyo: JAPC & JOICFP, 1991.

Thienpont D, Rochette F, Vanparijs OFJ. **Diagnosing Helminthiasis Through Coprological Examination**. 2nd ed. Beerse: The Netherlands Janssen Research Foundation, 1986.

Yamaguchi T. **Color Atlas of Clinical Parasitology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1981.

Zaman V. **Atlas of Medical Parasitology**. 2nd ed. Sydney: ADIS Health Sciences Press, 1984.

Zapater RC. **Atlas Parasitológico de las Heces**. Buenos Aires: El Ateneo, 1963.

Abstracts

Biological Abstracts, desde 1929. EUA

Current List of Medical Literature, EUA.

Excerpta Medica, secção 4. Microbiologia, desde 1948, Holanda.

Helminthological Abstracts, desde 1932, Inglaterra.

Index Catalogue of Medical and Veterinary Zoology, 1832-1952.5.

Index Medicus, 1878-1889, 1903-1927, 1960 até a presente data, EUA.

Quartely Cumulative Index, 1916-1926, 1927-1956.

Quartely Bibliography of Major Tropical Diseases, desde 1978.

Protozoological Abstracts, desde 1977, Inglaterra.

Review of Applied Entomology, Série B (Medical and Veterinary, desde 1913, Inglaterra.

Tropical Diseases Bulletin, desde 1913, Inglaterra.

Veterinary Bulletin, Inglaterra.

Periódicos

Acta Tropica, Suíça.

Acta Parasitologica, Polônia.

Acta Universitatis Carolinae-Biologica, República Checa.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Advances in Parasitology, EUA.
AIDS, EUA.
American Journal of Hygiene, EUA.
American Journal of Medicine, EUA.
American Journal of Public Health, EUA.
American Journal of Tropical Medicine, EUA.
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, EUA.
American Journal of Veterinary Research, EUA.
American Midland Naturalist, EUA.
Anais del Instituto de Biologia, México.
Anais del Instituto de Medicina Regional, Argentina.
Anais do Instituto de Medicina Tropical, Portugal.
Annales de la Societé Belge de Medicine Tropicale, Bélgica.
Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, França.
Annals of Tropical Medicine and Parasitology, Inglaterra.
Applied Parasitology, Alemanha.
Archivio Italiano di Schienze Mediche Tropicali e di Parassitologia, Itália.
Archives of Pathology & Laboratory Medicine, EUA.
Bacteriologia, Virusologia, Parasitologia, Epidemiologia, Romênia.
Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene, Alemanha.
British Medical Journal, Inglaterra.
Buletin Chileno de Parasitologia, Chile.
Bulletin de la Société Française de Parasitologie, França.
Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, França.
Bulletin of Entomological Research, Inglaterra.
Bulletin of the National Institute of Health, EUA.
Bulletin of the World Health Organization, Suíça.
Canadian Journal of Zoology, Canadá.
Canadian Medical Association Journal, Canadá.
Compts rendus de Societé de Biologie, França.
Cryptosporidium Capsule Newsletter, EUA.
Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, China.
Clinical Infectious Diseases, EUA.
Experimental Parasitology, EUA.
Folia Parasitologica, República Checa.
Giornale di Malattie Infettive e Parassitarie, Itália.
Indian Journal of Malariology, Índia.
Indian Journal of Medical Research, Índia.
Infection Control and Hospital Epidemiology, EUA.
International Journal for Parasitology, Austrália.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Japanese Journal of Medical Science and Biology, Japão.
Japanese Journal of Parasitology, Japão.
Journal of Clinical Microbiology, EUA.
Journal of Clinical Pathology, Inglaterra.
Journal of Helminthology, Inglaterra.
Journal of the Egyptian Society of Parasitology, Egito.
Journal of Eukaryotic Microbiology, EUA.
Journal of the Helmintology, Inglaterra.
Journal of the Helmintology Society of Washington, EUA.
Journal of the Hygiene, Inglaterra.
Journal of Infections Diseases, EUA.
Journal of the American Veterinary Medicine Association, EUA.
Journal of the American Medical Association, EUA.
Journal of the National Malaria Society, EUA.
Journal of Medical Entomology, EUA (Havaí).
Journal of Medical Microbiology, Inglaterra e Irlanda.
Journal of Parasitology and Parasitic Diseases, China.
Journal of Parasitology, EUA.
Journal of Protozoology Research, Japão.
Journal of Protozoology, EUA.
Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Inglaterra.
Korean Journal of Parasitology, Coréia.
Laboratory and Research Methods in Biology and Medicine, EUA.
Laboratory Medicine, EUA.
La Medicina Tropical, Espanha.
Lancet, Inglaterra.
Medical Journal of Australia, Austrália.
Medicine Tropicale, França.
Meditsinskaia Parasitologiia I Parazitarnye Bolenzi, Rússia.
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Brasil.
Molecular and Biochemical Parasitology, Holanda.
Mount Sinai Journal of Medicine, EUA.
Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), EUA.
Mosquito News, EUA
Nematologia Mediterranea, Itália.
New England Journal of Medicine, EUA.
Newsletter of the British Society for Parasitology, Inglaterra
Proceeding of the Helminthological Society of Washington, EUA.
Parassitologia, Itália.
Parazitologiia, Rússia.
Parasite, França.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Parasite Immunology, Inglaterra.
Parasitologia al Dia, Chile.
Parasitology, Inglaterra.
Parasitology Immunology, Inglaterra.
Parasitology International, Japão.
Parasitology Research, Alemanha.
Parasitology Today, Holanda.
Parassitologia, Itália.
Philippine Journal of Science, Filipinas.
Proceedings of the Helminthological Society of Washington, EUA.
Progress in Clinical Parasitology, EUA.
Public Health Reports, EUA.
Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine, Porto Rico.
Review of Infectious Diseases, EUA.
Reviews in Medical Microbiology, Inglaterra e Irlanda.
Revista Brasileira de Análises Clínicas, Brasil.
Revista de Biologia Tropica, Costa Rica.
Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Brasil.
Revista Latinoamericana de Microbiologia, México.
Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, Venezuela.
Revista Ibérica de Parasitologia, Espanha.
Revista di Parasitologia, Itália.
Russian Journal of Nematology, Rússia.
Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, Tailândia.
Systematic Parasitology, Holanda.
Transactions of the American Microscopical Society, EUA.
Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, Inglaterra.
Tropical and Geographical Medicine, Holanda.
Tropical Medicine and Parasitology, Alemanha.
Tropenmedizin und Parasitologie, Alemanha
Veterinary Parasitology, Holanda.
Wiadomosci Parazytologiczne, Polônia.
Zeitschrift für Parasitenkunde, Alemanha.

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

APÊNDICE 3



Parasitologia Humana — *Websites* e Internet

Geraldo Attilio De Carli

I. Fotografias, Figuras e Desenhos (*Images*)

• Atlas of Medical Parasitology, Carlos Denegri Foundation, Turin, Italy

• Parasitology Images Server. University of Iowa, Iowa City, Iowa.

• Parasites and Parasitology Resources. Ohio State University, Columbus, Ohio.

• QUT Parasitology Pages. Queensland University of Technology, Brisbane, Australia.

• World of Parasites. MacGill University, Montreal-Quebec, Canada.

II. Guia de Fontes de Pesquisa

Parasitologia e a Internet

Parasitology Name Index

http://www.york.biosis.org/zrdocs/zoolinfo/parasit.htm

A

Acta Parasitologica

American Society of Parasitologists — ASP Students' Home Page

American Society of Tropical Medicine & Hygiene (ASTMH)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Annals of Tropical Medicine and Parasitology
Australian Society for Parasitology (ASP)

B

British Society for Parasitology (BSP)

C

Canadian Society of Zoologists Parasitology Section Carlo Denegri Foundation, Italy
Careers in Parasitology
CELLS alive!
Centre for Applied Entomology and Parasitology (CAEP)
Centre for the Epidemiology of Infectious Disease
Centre for Parasite Biology (CPB)
Common Names of Plant Diseases
Czech Society for Parasitology

D

Daniel Shapiro's Zoonosis Page
Developments in Parasite Neurobiology
Directory of Parasitologists
Directory of Parasitologists in Canada
Diseases of Aquatic Organisms
DPDx — CDC Parasitology Diagnostic Web Site Division of Parasitic Diseases at the National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control & Prevention

E

Ecological Database of the World's Insect Pathogens (EDWIP)
Ecto-and Endo-Parasites
Ege University Medical Faculty Department of Parasitology
European Federation of Parasitologists
Experimental Parasitology

F

Folia Parasitologica Institute of Parasitology, Academy of Sciences, Czech Republic

H

Harold V. Manter Laboratory of Parasitology and Division of Parasitology University of Nebraska State Museum

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Hebrew University — Hadassah Medical School Department of Parasitology Helminthologia Slovak Academy of Sciences

Helminthological Abstracts CABI

Homepage of Parasites

I

Infectious Diseases and Parasites of Commercially Exploited Shellfish Synopsis, Fisheries and Oceans, Canada

Institute of Arthropodology and Parasitology (IAP)

Institute of Parasitology Academy of Sciences, Czech Republic

International Ichthyoparasitology Newsletter

International Institute of Parasitology (IIP) CABI Institute

International Journal for Parasitology Elsevier

J

Japanese Journal of Parasitology

Japanese Society of Parasitology

Journal of Helminthology CABIJournal of Parasitology American Society of Parasitologists

K

Korean Journal of Parasitology

Korean Society for Parasitology

L

Laboratoire de Taxonomie des Vecteurs ORSTOM, France

Louisiana State University Medical Center New Orleans, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology

M

McGill University Institute of Parasitology, Montreal, Canada

Molecular Analysis of Symbiosis

Molecular and Biochemical Parasitology

O

OnchoNET

P

ParaDis

Parasite

Parasite Genome Laboratory University of Cambridge, UK

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Parasitic Diseases website MIC-KIBIC at the Karolinska Institute

parasite-genome parasite genome databases and genome research resources, European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK

parasite-genome discussion list

Parasite Immunology

Parasites and Parasitological Resources Ohio State University

Parasites on the Web

Parasitologia al Dia

Parasitological Research Groups and Societies

Parasitological URLs (David Gibson's list of web resources of interest to parasitologists)

Parasitology Cambridge University Press PARASITOLOGY/bionet.parasitology Newsgroup Archive

Parasitology Diagnostic Services Oklahoma State University College of Veterinary Medicine

Parasitology Images List

Parasitology International

Parasitology News

Parasitology Program ICBM

Parasitology at University Erlangen-Nurnberg

Parasitology in Düsseldorf Heinrich-Heine University

Parasitology Resources Pasteur Institute

Parasitology Today Elsevier

Phytoparasitica

Pictorial Presentation of Parasites

Q

QUT Parasitology Pages Queensland University of Technology

R

Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene (RSTMH)

S

SciCentral: Best Parasitology Directories

Société Française de Parasitologie

SYMBIOSIS-RESEARCH BIOSCI

Systematic Parasitology Kluwer Academic Publishers

T

Trypanosomiasis and Land Use in Africa (TALA) Oxford University Dept of Zoology Trypnews On-line

Tulane University Department of Tropical Medicine

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Turkish Society for Parasitology (TSP)

U

University of Berne Institute of Parasitology Switzerland
US National Parasite Collection

V

Veterinary Parasitology Elsevier

W

Warwick University Ecology and Epidemiology
WHO Tropical Diseases Resources
World of Parasites
World Federation of Parasitologists (WFP)
WormLearn

Y

Yahoo: Parasites

III. Fotografias e Imagens de Parasitos

Queensland University of Technology:
www.life.sci.qut.edu.au/LIFESCI/darben/paramast.htm

Pictorial Presentation of Parasites:
http://parasite.biology.uiowa.edu/image

Parasites and Parasitological Resources:
www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/home.html

University of Delaware:
www.udel.edu/medtech/dlehman/MT372/images.html

Parasite Image Library:
www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Image_Library.htm

World Wide Web Virtual Library, Parasitology:
www.aan18.dial.pipex.com/images.htm

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

IV. Informações sobre a Parasitologia

Centers for Disease Control and Prevention:
www.dpd.cdc.gov/dpx/

Medical Chemical Corporation
www.med-chem.com

V. Referências Bibliográficas

NCBI National Library of Medicine (PubMed)
www.ncbi.nim.nih.gov/entrez/query.fcgi

Instituto Oswaldo Cruz
www.fiocruz.br

Periódicos CAPES
www.periodicos.capes.gov.br

Bireme-Centro Lation-Americano e do Caribe de Informação em Ciência e Saúde*::*
www.bireme.br

Kansas State University – Cyclospora cayetanensis
www.ksu.edu/parasitology/cyclospora/cyclospora.html

Kansas State University – Parasitology Library
www.ksu.edu/parasitology

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Abreviaturas



ácido	á
ácido ribonucléico	RNA
ácido ribonucléico ribossômico	rRNA
ácido ribonucléico mensageiro	mRNA
aminoácido	aa
anticorpo	Ac
antígeno	Ag
American Type Culture Collection	ATCC
atmosfera	*atm*
Centers for Disease Control	CDC
centímetro (10^{-2}m)	cm
concentração de íon hidrogênio	pH
controle de qualidade	CQ
ácido desoxirribonucléico	DNA
ácido desoxirribonucléico cinetoplástico	kDNA
densidade (massa/volume)	g/ml
grama (10^{-3}kg)	g
graus Celsius	°C
hematoxilina e eosina	HeE
hora (3.600 segundos)	h
litro	l
massa em massa	m/m
massa em volume	m/v

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

metro	m
micrômetro (10^{-6}m) ou mícron	μm
micrograma (10^{-6}g)	μg
microlitro (10^{-6}l)	μl
mililitro (10^{-3}l)	ml
miligrama (10^{-3}g)	mg
milímetro (10^{-3}m)	mm
minuto (60 segundos)	min
molar (concentração)	M
Milli-Q-Plus (Millipore)	MQP
milimol	mM
normal (concentração)	N
número do corante (Colour Index)	CI
Organização Mundial da Saúde	OMS
osmolaridade	osm
pé (1 pé = 30,48cm)	ft
por cento ou percentagem	%
quilograma	kg
rotações por minuto	rpm
segundo (tempo)	s
síndrome da imunodeficiência adquirida	SIDA/AIDS
temperatura	temp
unidade de campo gravitacional (na centrifugação)	*g*
unidade	u
unidades internacionais	UI
vírus da imunodeficiência humana	HIV
volume/volume	v/v

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Índice Remissivo



A

Abscesso(s)
  aspirados de cistos e, 211
  hepático, 212
Acanthamoeba
  castellanii, 604
  meio proteose peptone-extrato de levedo-glicose para, 422
Ácaros, 142
Acetato
  α-tocoferol, 400, 476
  de sódio, 273, 742
    triidratado, 249
  de sódio-ácido acético, 58, 69
  de sódio-ácido acético-formaldeído, 20 (v.t. SAF)
    solução fixadora, 251
  de uranil, 256
Acetona, 277
Ácido
  acético, 278
    glacial, 15, 250, 272, 363, 742
      método do, 31
  acético-éter, 58
  ascórbico, 454
  bórico, 742
  cítrico, 365
  clorídrico, 273, 742
    concentrado, 250
    solução aquosa de, 360
  clorídrico-éter, 58
  clorídrico-éter-xiol, 58
  clorídrico-triton NE-éter, 58
  crômico, 657, 658
  éter, centrífugo sedimentação, 61
  etilbenzotiazolino sulfônico, 502
  etilenodiaminotetracético, 293
  fosfotúngstico, 256, 272
    solução de, 95
  glutâmico, 454
  láctico, 740
  p-aminobenzóico, 400, 476
  periódico de Schiff, 229, 256, 267
  pícrico, 90, 250, 737
  sulfúrico, 746
    concentrado, 230
    solução aquosa de, 231
  tetrametilbenzidina, 502
Ácido-álcool, solução de, 251
Ácido-citrato-dextrose, solução de, 726
Acridina
  alaranjado de, 195
    coloração por, 256
  ésteres de, 501
Acriflavina, 407
Addis, contagem de, 389
Adenopatias, 385
Aerossóis infectantes, 626
AFA fixador (v.t. álcool-formaldeído-ácido acético)
Ágar, cultura em placa de, 419
  ágar não-nutritivo, 419
  de *Strongyloides stercoralis* em, 124

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

amostra, 125
meio de cultura, 125
método, 125
observações, 126
reagentes, 125
exame das placas, 421
meio de Page, 419
monoxênica, 420
observações, 422
preparação das placas, 419
reagentes, 419
Agarose, géis de, 545
Agente(s)
antiumidade, 235
fixadores em histologia, 561
soluções, 562
de formaldeído a 10%, 562
fixador de Bouin, 562
salina de formaldeído a 10%, 562
tamponada de formaldeído a 10%, 562
Aglutinação
reações de, 496
coaglutinação, 498
de cristais de colesterol, 497
direta, 496
hemaglutinação, 497
inibição da hemaglutinação, 497
passiva ou indireta, 496
técnicas de, 513
AIDS/SIDA, 74, 223, 253, 265, 479, 581, 668
Alaranjado de acridina, 195
Albumina fixadora de Mayer, 251, 252
Álcool
etílico, 11, 230, 272, 619, 658
absoluto, 250
etílico-amônia, solução de, 251
formaldeído-ácido acético, 735
glicerinado, 735
isopropílico, 619
metílico, 230, 277, 296, 619
polivinílico, 14
modificado, 17
Alsever, solução de, 727
Ameba(s), 143, 664
comensal, 208
intestinais, 672
Blastocystis hominis, 679
Endolimax nana, 678
cistos, 678
trofozoítos, 678
Entamoeba coli, 676
cistos, 677
trofozoítos, 676
Entamoeba hartmanni, 677
cistos, 677
trofozoítos, 677
Entamoeba histolytica, 674
cistos, 675
trofozoítos, 674
Iodamoeba bütschlii, 678
cistos, 678
trofozoítos, 678
meio
basal para, 413
completo para, 413
meningoencefalite por, 214
Amebas de vida livre, 143, 417-428
amostras, 418
cultura em placa de Ágar, 419
ágar não-nutritivo, 419
exame das placas, 421
meio de Page, 419
monoxênica, 420
observações, 422
preparação, 419
reagentes, 419
exflagelação dos organismos, 424
meio modificado de Nelson para *Naegleria fowleri*, 423
preparação, 424
reagentes, 423
meio proteose peptone-extrato de levedo-glicose, 422
inoculação e axenização da cultura, 423
para acanthamoeba, 422
preparação, 423
Amebíase, 521
cutânea, diagnóstico, 216
intestinal, 150
primária, 215
secundária, 215
Amido de arroz, 403
American Type Culture Collection quality control (ATCC), 604
organismos (parasitos para controle de qualidade)
(ATCC 30.010) *Acanthamoeba castelanii*, 604
(ATCC30.133) *Naegleria gruberi*, 604
(ATCC 30.925) *Entamoeba histolytica* HU-1:CDC, 602
(ATCC 30.015) *Entamoeba histolytica* HK-9, 602
(ATCC 30.001) *Trichomonas vaginalis*, 602
(ATCC 30.883) *Leishmania mexicana*, 602
(ATCC 30.160) *Trypanosoma cruzi*, 602
Amônia, 366
Amônio
solução de hidróxido de, 360
sulfato de, 413
Amostra fecal, 3-26
colheita, fezes emitidas espontaneamente, 4
estabilidade das, 7
exame direto a fresco de, 35
fezes emitidas com o uso de laxantes, 7
múltiplas, 5
preservação da, 7
controle de qualidade dos preservadores, 21
fixador acetato de sódio-ácido acético-formaldeído, 20
fixador álcool polivinílico, 14
modificado, 17

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

fixador de Schaudinn, 11
modificado, 13
fixador fenol-álcool-formaldeído, 23
fixador mertiolato-iodo-formaldeído, 18
solução de formaldeído, 9
Amostra fecal fresca e preservada, 27-81
colorações temporárias, 37
exame direto para a pesquisa de ovos de Helmintos, 47
método do esfregaço espesso de Celofane, 47
exame macroscópico, 28
simples observação, 29
tamisação, 29
exame microscópico, 33
direto a fresco, 34
preparações salinas, 34
identificação de proglotes de *Taenia* spp., 29
método
da tinta da China, 32
de Campos, 31
do ácido acético glacial, 31
soluções de iodo, 38
de D'Antoni modificada, 39
de Dobell e O'Connor, 39
de Lugol, 38
de mertiolato-iodo-formaldeído, 46
de Quensel, 41
tamponada de azul-de-metileno de Nair, 43
técnicas de concentração, 49
de flutuação, 50
centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco, 53
em solução de sulfato de magnésio, 53
em solução de sulfato de zinco, 52
em solução saturada de cloreto de sódio, 50
específica para coccídios, 72
centrífugo-flutuação em solução de Sacarose, 72
centrífugo-sedimentação pelo formaldeído-éter modificado, 74
centrífugo-sedimentação pelo hidróxido de potássio, 76
técnicas de sedimentação, 57
centrífugo-sedimentação
pela formalina-acetato de etila, 61
pela formalina-éter, 61
pelo acetato de sódio-ácido acético, 69
corante iodo-tricrômico para sedimento, 70
espontânea, 58
Ancilostomídeos, ovos de, 706
Ancylostoma duodenale, 704
ovos, 705
vermes adultos, 704
Anéis de Cabot, 149
Anfotericina B, 455
Angiostrongilíase abdominal, 351-354
diagnóstico de laboratório, 352
exame
anatomopatológico, 353
parasitológico das fezes, 353
imunodiagnóstico, 353
métodos moleculares, 353
Angiostrongylus
cantonensis, 214, 351
costaricensis, 351, 710
vermes adultos, 710
Anguillula aceti, 143
Anilina azul, 271, 272
Anilina-carbomatil-violeta, coloração pela, 256
Anisakis, 178
Anisaquíase gástrica, diagnóstico da, 178
Antibióticos, solução de, 439
Anticoagulantes, 727-729
solução
ácido-citrato-dextrose (ACD), 726
citrato-fosfato-dextrose (CPD), 726
de Alsever, 727
de citrato de sódio, 729
de heparina, 729
Anticorpos, 510
anti-*Leishmania*, 517
anti-*Toxocara*, 533
anti-*Trypanosoma cruzi*, 523
IgA, 511
IgD, 511
IgE, 511
IgG, 510
IgM, 510
monoclonais, 199
naturais, 509
séricos, 524
anti-*Schistosoma*, 531
Antígenos, 509
de excreção-secreção, 509
Aparelho
de Baermann, 116
de Bell, 133
Apolipoproteínas, 495
APV, fixador, 172, 208
Arakaki-Koga e Little, método de, 126
Areia hidática, 714
Artefatos que podem ser confundidos com organismos parasitos, 141-154
elementos derivados de contaminação externa, 143
artefatos dos líquidos orgânicos, 149
células humanas, 149
eosinófilos, 151
hemácias, 151
linfócitos, 151
macrófagos, 150
polimorfonucleares, 149
coccídios, 147
Cryptosporidium spp., 147
Isospora belli, 147
Leishmania, 148
microsporídios, 147
Trypanosoma, 148
cristais de Charcot-Leyden, 151

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Helmintos, 148
larvas de, 148
microfilárias, 149
ovos de, 148
vermes adultos, 148
infecções espúrias, 152
larvas de insetos, 152
não-humanos encontrados nas fezes, 151
protozoários, 143
amebas, 143
ciliados, 147
flagelados, 147
sangue, 149
elementos em trânsito, 142
Ascaris lumbricoides, 702
ovos, 155, 702
vermes adultos, 158, 702
ASM III (v.t. ver centrífugo-sedimentação pelo sulfato de, sódio-ácido clorídrico-triton-éter)
Aspirado(s), 211-215
baço, 212
biópsia ou curetagem nas bordas das lesões, 213
colheita de lavado broncoalveolar, 212
da medula óssea, 212
de cistos e abscessos, 211
de nódulos linfáticos, 212
exame do, 213
duodenal, 211
fígado e pulmão, 212
líquido cefalorraquidiano, 214
colhido por aspiração, 215
pela fibroscopia, 211
transtraqueal, 658
traqueal, 657
úlceras cutâneas, 213
Aspirado duodenal, 482
exame do, 170
método da cápsula duodenal, 170
colheita da amostra, 171
controle de qualidade, 172
observações, 1723
procedimento, 172
reagentes, 171
Atomol, 501
Auramina-fucsina fenicada, coloração por, 256
Auramina-rodamina, coloração por, 256
Australian bee pollen, 143
Auto-anticorpos, 507
Autoclave, 612
controle de qualidade, 612
manutenção preventiva, 612
AVL (v.t. amebas de vida livre)
Azida sódica, 135
Azul
cresil brilhante, 193
de Evans, 218
Azul-de-metileno, 193, 295, 301
de Nair, solução de, 43
solução aquosa, 236
saturada de, 42

B

Babesia
bigemina, 291
bovis, 346
canis, 346
divergens, 345
gibsoni, 348
microti, 346
Babesiose humana, 345-350
imunodiagnóstico, 347
reação da imunofluorescência indireta, 347
inoculação em animais, 348
métodos moleculares, 348
reação em cadeia da polimerase, 348
métodos parasitológicos, 345
exame microscópico, 345
método de concentração, 347
outros resultados de laboratório, 349
Bacillus stearothermophilus, 612
Background, coloração de, 570
Baço, aspirados, 212
Bacteremia, 149
Bactérias intestinais patogênicas, 649
Bacto crystal violet, 244
Bacto-ágar, 441
Bacto-peptona, 414
Baermann-Moraes, método de, 116
amostra, 116
aparelho, 116
funil de, 179
método de, 354
observações, 117
Bailenger, técnica de, 58
Balamuth, meio de, 408
inoculação, 409
preparação do meio, 408
reagentes, 408
solução
concentrada de fígado, 408
tampão de fosfato, 408
Balamuthia, 417
mandrillaris, 218
Balança, 613
manutenção preventiva, 613
Balantidium
coli, 149, 603, 683
cistos, 684
trofozoítos, 683
minutum, 147
Balantiophorus minutis, 147
Bálsamo-do-canadá, 327, 573
Bancos de sangue, 523
Bancroftose, 377
Banho de água, 612
equipamento
controle de qualidade, 613
manutenção preventiva, 612
Barbosa, método de, 134
Bário, contraste sulfato de, 126
Bartholin, glândulas de, 179
Bayer, solução de, 739

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Bell
aparelho de, 133
método de, 133
amostra, 133
Berlin, técnica de, 76
Bexiga
exame da, 217
mucosa da, 217
Bezerro, soro fetal de, 463
Bicromato de potássio, 738, 746
Bilirrubinemia, 349
Biologia molecular, 508
aplicada às infecções parasitárias, 508
métodos indiretos, 508
Biomphalaria, 530
Biópsia
cutânea, 369
procedimento, 369
reagentes, 369
da córnea, 482
raspados e material de, 217
método, 218
reagentes, 217
de duodeno, 482
de músculo, 482
de sinonasal, 482
ou curetagem nas bordas das lesões, 213
pulmonar a céu aberto, 657
retal, 217
transbrônquica, 657, 658
Biosate peptone, meio, 431
Biossegurança em laboratórios de parasitologia, 623-638
boas práticas de laboratório, 635
capelas de segurança biológica, 627
classificação dos microrganismos por classe de risco, 630
conceito e importância da biossegurança, 624
descontaminação do material de trabalho, 634
equipamento de proteção, 626
laboratórios clínicos, 626
níveis de biossegurança, 625
parasitos, 631
cestóides, 633
nematóides, 633
protozoários, 632
trematódeos, 634
Biotina, 400, 476
Bisturi fino, 85
Blagg, técnica de, 58
Blastocrithidia triatominae, 316
Blastocystis hominis, 159, 649-654, 679
diagnóstico de laboratório, 651
Blé, fixador de, 736
Blocos de parafina, console para confecção de, 567
Bolo fecal, 32, 51
Bolores, 617
Borato de sódio, 658
Botijão criobiológico, 468
Bouin
fixador de, 562
líquido de, 736
Brain Heart Infusion, meio de cultura, 442
observação, 443
preparação, 442
reagentes, 442
Brometo de etídio, 550
Brooke, método de, 102
amostra, 102
características da coloração, 104
coloração da amostra, 103
observações, 104
preparação das soluções, 102
reagentes, 102
Brugia
malayi, 183, 373
timori, 373
Buchner, funil de, 133, 408
Bucki, solução de, 38
Budzko e Kierszanbaum, método de, 310
Búfalo, soro de, 458
Burrow, corante de, 730

C

Cabot, anéis de, 149
Cádmio, solução de cloreto de, 42
Cálcio
cloreto de, 444
pantotenato de, 400, 476
Calcofluor, 657
branco, 218
uso de, 217
Calgon-éter-xiol, 58
Câmara de Thoma, 469
Campos
coloração pelo método de, 31
método de, 31
Canadá, bálsamo do, 573
Candida spp., 152
Capelas de segurança biológica, 614, 627
controle de qualidade, 614
manutenção preventiva e cuidados importantes, 614
Capillaria
hepatica, 152
philippinensis, 604, 703
ovos, 703
vermes adultos, 703
Cápsula duodenal
Entero Test para a colheita do conteúdo duodenal, 173
método da, no exame do aspirado duodenal, 170
colheita da amostra, 171
controle de qualidade, 172
observações, 1723
procedimento, 172
reagentes, 171
Carbol-Xilol, 93
Carbonato
de lítio, solução aquosa saturada de, 92
de sódio, 742

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Cardiolipina, 497
Carga viral, 508
Carnoy, fixador de, 739
Carpoglyphus lactus, 143
Carrazzi, hematoxilina de, 381
Carvão, cultura de larvas nematóides em, 123
  amostra, 123
  método, 123
  observações, 124
  reagentes, 123
Casca quitinosa calcária, ruptura da, 528
Casoni, teste intradérmico de, 532
Cavalo, soro de, 455
Ceco, 165
Celofane, esfregaço espesso de, 48
Célula(s)
  brancas sangüíneas, 199
  de leveduras, 151
  de rim
    de cão, 481
    de coelho, 481
    de macaco, 481
  E6, 481, 483
  Eagle, 481
  humanas, 149
    eosinófilos, 151
    hemácias, 151
    linfócitos, 151
    macrófagos, 150
    polimorfonucleares, 149
  infectada, 507
  MDCK, 481
  R, 362
  RK-13, 481, 483
  RPMI, 481
  sangüíneas móveis, 214
  SFB, 481
  T, 520
Centrífuga, 615
  controle de qualidade, 615
  manutenção preventiva e cuidados especiais, 615
Centrifugação
  do micro-hematócrito, 309
    método da centrifugação do micro-hematócrito QBC, 310
    procedimento
      de Feilij, 309
      de La Fuente, 310
  técnica da urina concentrada, 179
    colheita da amostra, 180
    controle de qualidade, 181
    método, 181
    observações, 181
    reagentes, 180
Centrífugo-flutuação em solução
  de Sacarose, 72
  de sulfato de zinco, 53
Centrífugo-sedimentação
  pela formalina-acetato de etila, 61
  pela formalina-éter, 61
  pelo acetato de sódio-ácido acético, 69
  pelo formaldeído-éter modificado, 74
  pelo hidróxido de potássio, 76
Cepas
  CL, 436
  IFLA/BR/67/PH8, 436
  MHOM/BR/75M2903, 436
  San Agustin, 436
  SC-58, 436
  Y, 436
Cestóides, 670, 734
  dos tecidos, 671, 714
    Echinococcus granulosus, 714
      areia hidática, 714
      ovos, 714
      vermes adultos, 714
  intestinais, 670, 711
    Hymenolepis diminuta, 713
      ovos, 713
      vermes adultos, 713
    Hymenolepis nana, 712
      ovos, 713
      vermes adultos, 712
    Taenia solium e *Taenia saginata*, 711
      cisticerco, 712
      ovos, 712
      vermes adultos, 711
Chagas, doença de, 315, 435, 506, 669
Charcot-Leyden, cristais de, 151
Chilomastix mesnili, 149, 665, 679
  cistos, 680
  trofozoítos, 679
Chlorazol black, preparação e coloração pelo corante, 109
  amostra, 110
  características da coloração, 112
  coloração da amostra, 111
  preparação
    das soluções, 110
    do corante, 111
  reagentes, 110
Chromotrope, 103
  2R, 267
Ciliados, 666
  intestinais, 683
    Balantidium coli, 683
      cistos, 684
      trofozoítos, 683
Cisticerco de *Taenia solium* e *Taenia saginata*, 712
Cisticercose, 506, 528
Cistos e abscessos, aspirados de, 211
Citocinas, dosagem de, 521
Citopatologia, 656
Citrato
  de sódio, 308, 422
    solução de, 729
  férrico amoniacal, 399
Citrato-fosfato-dextrose, 449, 726
Clearance de creatinina, 390
Clonorchis sinensis, 49
Cloreto
  de cádmio, solução de, 42
  de cálcio, 444
  de cobre, 739
  de colina, 400

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

de magnésio, 444, 547
de mercúrio, 738
de mercúrio-II, solução aquosa saturada de, 11
de ouro, 658
de piridoxal, 400, 476
de piridoxina, 476
de potássio, 439, 741
de sódio, 439, 741
solução saturada de, 50
de tiamina, 400, 476
CMRL 1055, meio de cultura, 198
Coaglutinação, 498
Cobre
cloreto de, 739
solução de sulfato de, 617
sulfato de, solução de, 13
Coccídios, 147, 666
Cryptosporidium spp., 147
Isospora belli, 147
Leishmania, 148
Microsporídios, 147
técnica de concentração específica para, 72
centrífugo-flutuação em solução de Sacarose, 72
centrífugo-sedimentação
pelo formaldeído-éter modificado, 74
pelo hidróxido de potássio, 76
Coccídios intestinais, 223, 684
considerações gerais, 223
Cryptosporidium parvum, 224, 684
oocistos, 684
Cyclospora cayetanensis, 226, 684
oocistos, 684
Isospora belli, 229, 685
oocistos, 685
métodos de coloração, 229
de Giemsa, 260
amostra, 260
características da coloração, 260
observações, 260
de Heine, 242
amostra, 242
características da coloração, 242
coloração da amostra, 242
observações, 243
reagentes, 242
de Henriksen-Pohlenz, 230
amostra, 230
características da coloração, 231
coloração da amostra, 231
observações, 231
preparação das soluções, 230
reagentes, 230
modificado da safranina, 237, 245
amostra, 238
características de coloração, 239
coloração da amostra, 238
controle de qualidade, 239
preparação das soluções, 238
reagentes, 238
modificado da safranina de oocistos de *Cryptosporidium parvum*, 248
amostra, 248
coloração da amostra, 249
observações, 247
reagentes, 248
soluções, 248
modificado da safranina de oocistos de *Cyclospora cayetanensis*, 245
amostra, 246
características da coloração, 247
coloração da amostra, 246
reagentes, 246
soluções, 246
modificado de Kinyoun, 232, 255
amostra, 232
características da coloração, 234, 260
coloração da amostra, 233, 259
controle de qualidade, 234
observações, 234
preparação das soluções, 232, 256
reagentes, 232, 256
modificado de Ziehl-Neelsen, 235
amostra, 235
características da coloração, 237
coloração da amostra, 236
observações, 237
preparações das soluções, 236
reagentes, 235
modificado de Ziehl-Neelsen-Dimetilsulfóxido, 239
amostra, 239
características da coloração, 241
controle de qualidade, 241
reagentes, 239
negativa pela fucsina-fenicada, 243
amostra, 243
características da coloração, 244
coloração da amostra, 244
reagentes, 243
pela hematoxilina férrica modificada, 249
amostra, 249
características da coloração, 253
coloração da amostra, 252
controle de qualidade, 254
preparação das soluções, 250
reagentes, 249
rápido da safranina, 244
amostra, 244
características da coloração, 245
coloração da amostra, 245
observações, 245
preparação das soluções, 244
reagentes, 244
Coelho
células de rim do, 481
sangue desfibrinado de, 441
Coleções de parasitos de referência, 603
helmintos
do sangue e dos tecidos, 604
intestinais, 604
protozoários
do sangue e dos tecidos, 603
intestinais e urogenitais, 603
Colina, cloreto de, 400
Colite ulcerativa, 150

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Cólon, 165
Coloração (v.t. Corante)
de *background*, 570
de Giemsa, 196, 197, 296
características da coloração, 197
coloração da amostra, 196
controle de qualidade, 197
observação, 196
reagentes e preparação, 196
de Gomori, 84
de Gram-*Chromotrope* para microsporídios, 277
amostra, 277
características da coloração, 280
coloração da amostra, 279
controle de qualidade, 280
preparação das soluções, 277
reagentes, 277
de Heidenhain, 94
de Nair, 38
de Papanicolaou, 658
de Pappenhein, 200
de Quensel, 38
de Velat-Weinstein-Otto, 38
de Wright, 296
do tricrômico, 208
dos esfregaços sangüíneos, 296
de Field, 300
coloração, 301
preparação dos corantes, 301
reagentes, 300
de Giemsa, 296
coloração, 298
controle de qualidade, 299
preparação do corante, 296
reagentes, 296
de Leishman, 301
coloração, 302
preparação do corante, 302
reagentes, 302
de Wright, 302
coloração, 303
controle de qualidade, 304
preparação do corante, 303
reagentes, 302
para a identificação de parasitos de diferentes tecidos, 218
pela hematoxilina, segundo Carrazzi, 382
biópsia, 385
coloração, 384
fixação, 383
periodicidade, 384
pesquisa de verme adulto, 385
preparação do corante, 383
reagentes, 382
teste provocativo com DEC, 384
ultra-sonografia, 385
pela Prata de Grocott, 657
pela solução de iodo de D'Antoni, 195
coloração da amostra, 195
preparações fixadas e coradas, 195
reagentes, 195
pelo *Chromotrope*, 283
características da coloração, 284
coloração da amostra, 284
controle de qualidade, 284
preparação das soluções, 283
reagentes, 283
pelo *Chromotrope* (Weber-verde), 268
amostra, 268
características da coloração, 271
coloração da amostra, 270
preparação das soluções, 269
reagentes, 268
pelo *Chromotrope* a quente ou modificação de Kokoskin, 275
amostra, 275
características da coloração, 277
coloração da amostra, 276
preparação das soluções, 275
reagentes, 275
pelo *Chromotrope* ou modificação de Ryan, 271
amostra, 271
características da coloração, 274
coloração da amostra, 273
preparação das soluções, 272
reagentes, 271
pelo método de Campos, 31
pelo tricrômio modificado (Weber-verde e Ryan-azul), 274
controle de qualidade, 274
pelos fluorocromos, 256
permanentes, 588
derivadas de hematoxilina, 589
pelo tricrômico, 590
rápida a quente pelo Gram-*Chromotrope*, 280
amostra, 280
características da coloração, 283
coloração da amostra, 282
preparação das soluções, 281
reagentes, 280
técnicas de, 570
corantes, 571
hematoxilina de Harris, 571
solução de eosina a 1%, 571
Vaginal Identification of Pathogens, método de, 194
Coloração de esfregaços permanentes, preparação e, 83-114
derivadas da hematoxilina, 84
pela hematoxilina férrica segundo Heidenhain
modificada por Burrows, 85
amostra, 85
coloração da amostra, 87
observações, 88
preparação das soluções, 87
reagentes, 86
modificada por Mélvin e Brooke (FNP), 88
amostra, 88
coloração da amostra, 90
preparações das soluções, 89
reagentes, 88

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

modificada por Mélvin e Brooke (FP), 91
amostra, 91
coloração da amostra, 93
preparações das soluções, 92
reagentes, 91
pela hematoxilina férrica-ácido clorídrico, 97
amostra, 97
características da coloração, 99
coloração da amostra, 98
controle de qualidade, 99
preparações das soluções, 97
reagentes, 97
fosfotúngstico, 94
amostra, 94
características da coloração, 96
coloração da amostra, 96
preparação das soluções, 95
reagentes, 94
pela tionina, 107
amostra, 107
características da coloração, 108
coloração da amostra, 108
preparação da solução, 108
reagentes, 108
pelo corante
Chlorazol black, 109
amostra, 110
características da coloração, 112
coloração da amostra, 111
preparação das soluções, 110
preparação do corante, 111
reagentes, 110
Polychrome IV, 112
pelo tricrômico, 100
método de Brooke, 102
amostra, 102
características da coloração, 104
coloração da amostra, 103
observações, 104
preparação das soluções, 102
reagentes, 102
método de Wheatley, 100
amostra, 100
coloração da amostra, 101
preparação das soluções, 101
reagentes, 100
método de Yang-Scholten, 105
amostra, 105
coloração da amostra, 106
controle de qualidade, 106
corante tricrômico, segundo Garcia-Bruckner, 105
preparação da amostra, 106
preparação das soluções, 105
reagentes, 105
solução de fenol de Kohn, 108
amostra, 109
coloração da amostra, 109
observações, 109
reagentes, 109
Coloração, métodos de, 229
de Giemsa, 260
amostra, 260
características da coloração, 260
observações, 260
de Heine, 242
amostra, 242
características da coloração, 242
coloração da amostra, 242
observações, 243
reagentes, 242
de Henriksen-Pohlenz, 230
amostra, 230
características da coloração, 231
coloração da amostra, 231
observações, 231
preparação das soluções, 230
reagentes, 230
modificado da safranina, 237, 245
amostra, 238
características de coloração, 239
coloração da amostra, 238
controle de qualidade, 239
de oocistos
de *Cryptosporidium parvum*, 248
de *Cyclospora cayetanensis*, 245
preparação das soluções, 238
reagentes, 238
modificado de Kinyoun, 232, 255
amostra, 232
características da coloração, 234, 260
coloração da amostra, 233, 259
controle de qualidade, 234
observações, 234
preparação das soluções, 232, 256
reagentes, 232, 256
modificado de Ziehl-Neelsen, 235
amostra, 235
características da coloração, 237
coloração da amostra, 236
observações, 237
preparações das soluções, 236
reagentes, 235
modificado de Ziehl-Neelsen-Dimetilsulfóxido, 239
amostra, 239
características da coloração, 241
controle de qualidade, 241
reagentes, 239
negativa pela fucsina-fenicada, 243
amostra, 243
características da coloração, 244
coloração da amostra, 244
reagentes, 243
pela hematoxilina férrica modificada, 249
rápido da safranina, 244
Complemento, reação de fixação do, 178
Complexos Ag-Ac, 511
Concentração do sangue, 305
centrifugação
do micro-hematócrito, 309
método da centrifugação do micro-hematócrito QBC, 310
procedimento de Feilij, 309
procedimento de La Fuente, 310
do sangue, 306

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

amostra, 306
controle de qualidade, 307
método, 306
reagentes, 306
método
da membrana filtrante, 310
de centrifugação tríplice, 307
amostra, 307
controle de qualidade, 308
método, 307
reagentes, 307
técnica
da diferença de gravidade, 310
método de Budzko-Kierszanbaum, 310
método de Rohwedder, 310
das fito-hemaglutininas, 308
amostra, 308
controle de qualidade, 309
método, 309
reagentes, 308
Concentração, técnicas de, 49
de flutuação, 50
centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco, 53
em solução
de sulfato de zinco, 52
de sulfato de magnésio, 53
saturada de cloreto de sódio, 50
específica para coccídios, 72
centrífugo-flutuação em solução de Sacarose, 72
centrífugo-sedimentação
pelo formaldeído-éter modificado, 74
pelo hidróxido de potássio, 76
Condensador, 642
poder de resolução, 642
Congelação, técnica de, 563
Connaught Medical Research Laboratory (CMRL), 1066
meio de cultura, 463
observação, 463
preparação, 463
Conselho Nacional de Saúde, 630
Contadores eletrônicos de partículas do tipo *cell counter*, 436
Conteúdo
biliar, 235
duodenal, 235
cápsula duodenal *Entero Test* para a colheita do, 173
pulmonar, 235
Contraste sulfato de bário, 126
Controle de qualidade em parasitologia clínica, 577-609
coleções de parasitos de referência, 603
helmintos
do sangue e dos tecidos, 604
intestinais, 604
protozoários
do sangue e dos tecidos, 603
intestinais e urogenitais, 603
controle de qualidade
externo, 580
interno, 579
cultivo de protozoários, 601
Entamoeba histolytica, 601
Leishmania spp. e *Trypanosoma cruzi*, 602
Trichomonas vaginalis, 601
equipamento, 583
exame de outros espécimes do trato intestinal e sistema urogenital, 598
material de sigmoidoscopia, 598
esfregaços permanentes corados, 598
exame direto a fresco, 598
pesquisa de *Trichomonas vaginalis*, 599
coloração de Giemsa, 599
escarro, 600
exame direto a fresco, 599
garantia de qualidade, 578
atividades
analíticas, 579
pós-analíticas, 579
pré-analíticas, 578
manual de procedimentos, 580
material de referência, 580
morfometria feita com micrômetro ocular, 584
parasitos da *American Type Culture Collection* para controle de qualidade, 604
parasitos do sangue e dos tecidos, 595
coloração de esfregaços sangüíneos, 597
método da membrana filtrante, 598
técnica de Knott, 597
esfregaços estirado e espesso, 595
coloração de Giemsa, 595
coloração pela hematoxilina de Delafield, 596
protozoários e helmintos intestinais, 584
colheita da amostra fecal, 584
colorações específicas para coccídios, 590
colorações específicas para microsporídios, 591
métodos de Weber-Ryan, 591
colorações permanentes, 588
derivadas de hematoxilina, 589
pelo tricrômico, 590
colorações temporárias, 588
soluções de iodo, 588
exame direto a fresco, 585
isolamento e cultura de larvas de nematóides, 593
método da cápsula duodenal, 594
pesquisa de *Enterobius vermicularis*, 594
preservadores, 586
fixador álcool polivinílico, 587
fixador de Schaudinn, 587
reagentes, corantes e outras soluções, 585
técnicas de concentração, 592
centrífugo-flutuação em solução de sacarose, 592
de flutuação, 592
de sedimentação, 593
qualificação do pessoal técnico, 583
Coplin, cuba de, 99, 172, 210, 253, 298

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Corante (v.t. Coloração), 729-733
Chlorazol black, preparação e coloração pelo, 109
amostra, 110
características da coloração, 112
coloração da amostra, 111
preparação
das soluções, 110
do corante, 111
reagentes, 110
de Burrow, 730
de Kinyoun, 230
de Kohn, 256
de Quensel, 42
de Sargeaunt, 732
de Thonson, 732
de tricrômico, 208
do alaranjado de Acridina, 731
eosina salina, 731
Fuchsin-carbol, 233, 242
fucsina-ácida-fast-green, 729
hematoxilina ácida de Ehrlich, 730
iodo-tricrômico para sedimento, 70
light green SF *yellowish*, 232
Polychrome IV, preparação e coloração pelo, 112
quimiofluorescente, 217
sulforodamine B, 342
temporárias para protozoários, 733
tricrômico, segundo Garcia e Bruckner, 105
Vaginal Identification of Pathogens, 193
amostra, 193
características da coloração, 194
coloração da amostra, 194
preparações das soluções, 194
reagentes, 194
Córnea
biópsia de, 482
lesões ulceradas da, 417
raspados e material de biópsia da, 217
método, 218
reagentes, 217
Corpos de Howell-Joly, 149
Corpúsculos calcários, 212
CPLM, meio de cultura, 198
Creme leucocitário, 306
Creosoto de faia, 360
Criopreservação de cepas de *Plasmodium falciparum*, 450
controle de qualidade, 451
técnica descrita
por Christofinis-Miller, 450
solução crioprotetora de DMSO a 20%, 450
por Meryman-Hornblower, 451
Cristal(is)
de Charcot-Leyden, 151
de colesterol, teste de aglutinação de, 497
violeta, 244
Cromatina, 672
Cromofilia, 84
Cross-linking of proteins, 247
Cryptosporidium
parvum, 72, 224, 591, 684
parvum, oocistos de, 225, 684
método de coloração da safranina de, 248
amostra, 248
coloração da amostra, 249
observações, 247
reagentes, 248
soluções, 248
procedimentos de coloração para, 256
oocistos de, 72
Culex quinquefasciatus, 373
Cultura(s)
celulares
cultivo de microsporídios em, 481
in vitro, 480
metodologia das, inoculadas, 484
processamento das amostras biológicas nas, 482
em placa de Ágar, 419
ágar não-nutritivo, 419
exame das placas, 421
meio de Page, 419
monoxênica, 420
observações, 422
preparação, 419
reagentes, 419
Cyclospora
cayetanensis, 76, 84, 226, 591, 684
cayetanensis, oocistos de, 72
método de coloração da safranina de, 245
amostra, 246
reagentes, 246
soluções, 246
coloração da amostra, 246
características da coloração, 247
oocistos, 684
oocistos de, 685
Cyclospora spp. *versus* artefatos, 258
Cysteine-Peptone-Liver-Maltose, meio de cultura, 458
preparação, 459
Cysteine-Tryptose-Liver-Maltose, meio de cultura, 460
preparação, 461
Cysticercus
bovis, 712
cellulosae, 712
Cytoseal 60, 283

D

D'Antoni
modificada, solução de, 39
solução de iodo de, 208
coloração pela, 195
da amostra, 195
preparações fixadas e coradas, 195
reagentes, 195
D'Antoni, solução de iodo,

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Delafield, corante,
  hematoxilina, de,
Deficiência imunológica, 526
Densitômetro, 52, 68
Deoxinucleotídeos trifosfatados, 547
Derivados
  de Henriksen-Pohlenz, 241
  de Romanowsky, 196
Descongelação automática, dispositivo
 de, 617
Descontaminação do material de
 trabalho, 634
Desidratação, 564
Desinfetantes fenólicos, 616
Detergente não-iônico, 61
Detritos fecais, 47
Dextrose, 741
Diaminofenilidona, coloração por, 256
Diamont, meios de cultura de, 198
Diatomácea, grão de pólen,
Dicrocoelium dendriticum, 148, 152
Dientamoeba fragilis, 41, 603, 682
  trofozoítos, 682
Dietilcarbamazina, 179
Diidrogenofosfato
  de potássio, 189, 419, 432
    anidro, 296
  de sódio, 9
    monoidratado, 296
DIC, ver microscopia de contraste de fase
 ou do contraste diferencial de interferência
 (Nomarski)
Dimetilsulfóxido (v.t. DMSO), 448, 468
Dirofilaria immitis, 359, 596
Disenteria bacilar, 149
Diseritropoiese, 334
Dispositivo de descongelação
 automática, 617
DMSO (v.t. dimetilsulfóxido), 448, 468
DNA, 195, 508
  dosagem de, 545
  extração de, 545
  sonda de, 508
  tecnologia de, 510
Dobell-O'Connor, solução de, 38, 39
Doença(s)
  de Chagas, 315, 435, 506, 522, 669
  parasitárias, 493
Dor abdominal, 352
dot-ELISA, teste, 523
Donaldson, solução de,
Dracunculus medinensis,
Drogas antiesquistossomas, 217
Duodeno, biópsia de, 482

E

Eagle, 481
Echinococcus granulosus, 671, 714
  areia hidática, 714
  ovos, 714
  vermes adultos, 714
Edema pulmonar agudo, 335
Efeito *Tyndall*, 495
Ehrlich, hematoxilina ácida de, 730
Elefantíase, 375
Eletroforese de proteínas, 524
ELISA, 178
  com captura de IgM, 502
  teste, 516, 523
Emergência hospitalar, sistema
 de, 618
Encefalite
  granulomatosa amebiana, 417
  toxoplásmica, 528
Encephalitozoon
  cuniculi, 480
    esporos de, 484
  hellem, 269, 480
  intestinalis, 84, 218, 266, 480
  sp., 218
Encephalitozoon-like, 480
Endolimax, 41, 674
  nana, 151, 678, 682
    cistos, 678
    trofozoítos, 678
Endoscopia, 178
Ensaio(s)
  com marcadores enzimáticos, 501, 503
    ELISA com captura de IgM, 502
    enzimaimunoensaio, 501
      com micropartículas, 503
      *Enzyme Multiplied Immunoassay
       Technique*, 502
      *Enzyme-Linked Immunosorbent
       Assay*, 502
    Western Blotting, 503
  com marcadores fluorescentes, 498
    sistema avidina-biotina, 500
    testes fluorescentes heterogêneos, 499
      de modulação direta, 499
      de modulação dupla, 499
      de modulação indireta, 499
      imunofluorescência direta, 499
      imunofluorescência indireta, 500
  com marcadores radioativos, 501
    radioimunoensaio, 501
      radioallergosorbent test, 501
  de fluorimetria, 514
  de imuno-histoquímica, 500
    imunocitoquímica, 500
    imunoperoxidase, 500
  de neutralização, 498
  de quimioluminescência, 501
  imunoenzimático, 329
  imunorradiométrico, 501
  líticos, 498
    ensaio de neutralização, 498
    reação de fixação do complemento, 498
Entamoeba coli, 94, 676
  cistos, 677
  trofozoítos, 676
Entamoeba dispar, 36, 398
Entamoeba gingivalis, 663
Entamoeba hartmanni, 151, 398, 677
  cistos, 677
  trofozoítos, 677

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Entamoeba
histolytica, 36, 156, 218, 397, 674
cistos, 675
meio basal para ameba, 413
meio completo para ameba, 413
meio de Balamuth, 408
inoculação, 409
preparação do meio, 408
reagentes, 408
solução concentrada de fígado, 408
solução tampão de fosfato, 408
meio de Boeck and Drbohlav *Locke-Egg-Serm*, 409
controle de qualidade, 411
meio completo, 410
reagentes, 409
meio de Robinson, 411
cultivo xênico, 411
meio definido para crescimento de *Escherichia coli*, 412
reagentes, 412
meio *Trypticase-Yeast Extract-Iron-Serum, 398*
cultivo axênico, 398
amostra, 398
caldo nutritivo, 399
preparação, 399
reagentes, 398
inoculação e cultivo, 401
meio completo, 401
mistura de vitaminas, 399
meio *Trypticase-Yeast Extract-Serum-Gastric Mucin*, 402
cultivo xênico, 402
amido de arroz, 403
caldo nutritivo, 403
reagentes, 402
solução de Tween, 403
solução estoque de antibióticos, 404
solução tamponada de azul-de-metileno, 404
solução tamponada de fosfato pH 7, 2, 403
suspensão de amido de arroz, 404
trofozoítos, 674
Entamoeba moshkovkii, 146
Entellan, 327
Enterobacter aerogenes, 420
Enterobius vermicularis, 157, 703
ovos, 578, 704
pesquisa de, 165, 594
método da fita de celofane adesiva e transparente, 166
amostra e colheita, 166
controle de qualidade, 167
observações, 167
preparação e método, 166
reagentes, 166
método do *Swab* de vaselina e parafina, 169
amostra e colheita, 169
controle de qualidade, 169
observações, 170
preparação e método, 169
reagentes, 169
vermes adultos, 158, 703
Enterocytozoon bieneusi, 84, 218, 265, 480, 603
Enteromonas hominis, 682
cistos, 682
trofozoítos, 682
Enteroparasitos, 158
Enteropatasitoses, diagnóstico das, 58
Enzima lactato desidrogenase, 343
Enzimaimunoensaio, 501
com micropartículas, 503
Enzimas proteolíticas, 212
Enzyme Multiplied Immunoassay Technique, 502
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 502
Eosina
B, 301
hematoxilina e, protocolo básico para coloração com, 572
S, 571
salina, 731
solução de, 571
Y, 571
Eosinofilia pulmonar tropical, 388
Eosinófilos, 151
contagem absoluta de, 388
Equipamento de proteção, 626
coletiva, 627
individual, 627
Equipamentos, manutenção e controle de qualidade de, 611-622
autoclave, 612
controle de qualidade, 612
manutenção preventiva, 612
balança, 613
manutenção preventiva, 613
banho de água, 612
controle de qualidade, 613
manutenção preventiva, 612
capelas de segurança biológica, 614
controle de qualidade, 614
manutenção preventiva e cuidados importantes, 614
centrífuga, 615
controle de qualidade, 615
manutenção preventiva e cuidados especiais, 615
considerações gerais, 611
estufa(s)
de esterilização, 618
controle de qualidade, 618
manutenção preventiva, 618
microbiológicas, 617
controle de qualidade, 618
manutenção preventiva, 617
freezer, 617
controle de qualidade, 617
manutenção preventiva, 617
geladeira, 616
controle de qualidade, 617
manutenção preventiva e cuidados técnicos, 616
microscópio óptico, 619

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

controle de qualidade, 619
manutenção preventiva, 619
termômetros, 619
controle de qualidade, 621
manutenção preventiva, 620
Eritrócitos, 304
parasitados, destruição dos, 334
Eritromicina, 414
Erlenmeyer, frasco tipo, 130, 475
Escarro, 207-211
exame do, 207
expectorado: exame direto a fresco e preparações permanentes coradas, 208
colheita, amostra e preparação, 209
controle de qualidade, 209
método, 210
reagentes, 208
induzido, 657
Escherichia coli, 420
Esfregaço(s)
de secreção vaginal, 377
espesso ou esfregaço estirado, 339
fecal(is)
frescos, 91
preparação de, para coloração permanente, 86
método do, espesso de celofane, 47
permanentes corados, 176
amostra e colheita, 176
controle de qualidade, 177
método, 177
observações, 178
reagentes, 177
salinos, preparação dos, 35
Esfregaços permanentes, preparação e coloração de, 83-114
considerações gerais, 83
derivadas da hematoxilina, 84
pela hematoxilina férrica, segundo Heidenhain
modificada por Burrows, 85
amostra, 85
coloração da amostra, 87
observações, 88
preparação das soluções, 87
reagentes, 86
modificada por Melvin e Brooke (FNP), 88
amostra, 88
coloração da amostra, 90
preparações das soluções, 89
reagentes, 88
modificada por Melvin e Brooke (FP), 91
amostra, 91
coloração da amostra, 93
preparações das soluções, 92
reagentes, 91
pela hematoxilina férrica-ácido clorídrico, 97
amostra, 97
características da coloração, 99
coloração da amostra, 98
controle de qualidade, 99
preparações das soluções, 97
reagentes, 97
fosfotúngstico, 94
amostra, 94
características da coloração, 96
coloração da amostra, 96
preparação das soluções, 95
reagentes, 94
pela tionina, 107
amostra, 107
características da coloração, 108
coloração da amostra, 108
preparação da solução, 108
reagentes, 108
pelo corante *Chlorazol black*, 109
amostra, 110
características da coloração, 112
coloração da amostra, 111
preparação
das soluções, 110
do corante, 111
reagentes, 110
pelo corante *Polychrome* IV, 112
pelo tricrômico, 100
método de Brooke, 102
amostra, 102
características da coloração, 104
coloração da amostra, 103
observações, 104
preparação das soluções, 102
reagentes, 102
método de Wheatley, 100
amostra, 100
coloração da amostra, 101
preparação das soluções, 101
reagentes, 100
método de Yang-Scholten, 105
amostra, 105
coloração da amostra, 106
controle de qualidade, 106
corante tricrômico, segundo Garcia e Bruckner, 105
preparação da amostra, 106
preparação das soluções, 105
reagentes, 105
solução de fenol de Kohn, 108
amostra, 109
coloração da amostra, 109
observações, 109
reagentes, 109
Esfregaços sangüíneos
coloração dos, 296
de Field, 300
coloração, 301
preparação dos corantes, 301
reagentes, 300
de Giemsa, 296
coloração, 298
controle de qualidade, 299
preparação do corante, 296
reagentes, 296
de Leishman, 301
coloração, 302
preparação do corante, 302

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

reagentes, 302
de Wright, 302
coloração, 303
controle de qualidade, 304
preparação do corante, 303
reagentes, 302
preparação dos, 292
combinação de esfregaços estirados e espessos, 295
esfregaços espessos, 293
controle de qualidade, 294
preparação, 293
esfregaços estirados, 292
preparação, 293
Espécimes fecais
elaboração dos, 33
uso das objetivas do microscópio na avaliação dos parasitos nos, 37
Esponja de poliéster, 464
Esporos, 482
de *Encephalitozoon cuniculi*, 484
Esporozoários, 668
Esporozoíto, 336
Esquistossomose, 506
mansônica, 530
Esterilidade, teste de, 444, 462
Esterilização, estufa de, 618
controle de qualidade, 618
manutenção preventiva, 618
Estreptomicina, sulfato de, 422, 456
Estrongiloidose, 506
Estudo do líquido duodenal, 211
Estufa(s)
de esterilização, 618
controle de qualidade, 618
manutenção preventiva, 618
microbiológicas, 617
controle de qualidade, 618
manutenção preventiva, 617
Éter etílico, 57, 277
Etídio, brometo de, 550
Etila, formalina-acetato de, 61
Etil-eosina, 571
Eurytrema pancreaticum
Evans, azul de, 218
Exame
a fresco do sangue, 357
esfregaços sangüíneos espessos e corados, 357
preparação, 358
método da contagem em câmara, 359
procedimento, 359
cultural de protozoários, 160
da placenta, 527
da secreção urogenital, 178
de contagem
absoluta de eosinófilos, 388
de Addis, 389
de espécimes do trato intestinal e sistema urogenital, 598
material de sigmoidoscopia, 598
pesquisa de *Trichomonas vaginalis*, 599
coloração de Giemsa, 599
escarro, 600
exame direto a fresco, 599
de proteinúria de 24 horas, 390
de urina, 178
direto a fresco, 598
esfregaços permanentes corados, 598
do aspirado de nódulos linfáticos, 213
do escarro, 207
dos tecidos, 215-218
método do fragmento superficial da pele, 216
método, 216
reagentes, 216
pele, 215
raspados e material de biópsia da córnea, 217
método, 218
reagentes, 217
reto e bexiga, 217
tecidos muscular e subcutâneo, 216
parasitológico das fezes, 388
expressão dos resultados no, 155-162
considerações gerais, 155
macroscópico, 158
microscópico, 158
Exame do sangue, 291-311
coloração dos esfregaços sangüíneos, 296
de Field, 300
coloração, 301
preparação dos corantes, 301
reagentes, 300
de Giemsa, 296
coloração, 298
controle de qualidade, 299
preparação do corante, 296
reagentes, 296
de Leishman, 301
coloração, 302
preparação do corante, 302
reagentes, 302
de Wright, 302
coloração, 303
controle de qualidade, 304
preparação do corante, 303
reagentes, 302
concentração do sangue, 305
centrifugação do micro-hematócrito, 309
método da centrifugação do micro-hematócrito QBC, 310
procedimento de Feilij, 309
procedimento de La Fuente, 310
centrifugação do sangue, 306
amostra, 306
controle de qualidade, 307
método, 306
reagentes, 306
método da membrana filtrante, 310
método de centrifugação tríplice, 307
amostra, 307
controle de qualidade, 308
método, 307
reagentes, 307
técnica da diferença de gravidade, 310
método de Budzko-Kierszanbaum, 310
método de Rohwedder, 310

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

técnica das fito-hemaglutininas, 308
amostra, 308
controle de qualidade, 309
método, 309
reagentes, 308
preparação dos esfregaços sangüíneos, 292
combinação de esfregaços estirados e espessos, 295
esfregaços espessos, 293
controle de qualidade, 294
preparação, 293
esfregaços estirados, 292
preparação, 293
Excreção-secreção, antígenos de, 509
Exsudatos
uretrais, 191
vaginais, 463
Extrato(s)
antigênicos, 510
de fígado, 454
de levedo, 399, 403, 454
fildes, 455

F

Fasciola hepatica, 143, 715
ovos, 717
vermes adulto, 715
Fasciolopis buski, 50
Fast green, 103
Fator de necrose tumoral, 334
Faust, técnica de, 53
Feilij, procedimento de, 309
Feinberg-Whittington, meio de cultura de, 198, 460
preparação, 460
Fenol, 230, 321
solução aquosa de, 48
Fenol-álcool-formaldeído, 23
Fezes
colheita de (v.t. Amostras fecais)
emitidas
com o uso de laxantes, 7
espontaneamente, 4
consistência das, 29
exame parasitológico, 388
expressão dos resultados no, 155-162
considerações gerais, 155
macroscópico, 158
microscópico, 158
formadas, 28
frescas, 51
líquidas, 28
negativas, 45
pastosas, 28
semiformadas, 28
Fezes, ovos nas, demonstração e quantificação de, 129-140
considerações gerais, 129
método(s)
coprológicos quantitativos específicos para o diagnóstico do *Schistosoma mansoni*, 132
de Barbosa, 134
de Bell, 133
amostra, 133
aparelho de Bell, 133
de Kato-Katz, 134
amostra, 135
cálculo, 136
material, 135
observações, 136
reagentes, 135
solução aquosa glicerinada de verde de malaquita, 135
de Stoll modificado, 132
reagentes, 132
de Stoll-Hausheer, 130
amostra, 130
observações, 131
reagentes, 130
de Teesdale-Amin, 137
Fibroscopia, 211
aspirados pela, 211
Field, coloração de, 300
coloração, 301
preparação dos corantes, 301
reagentes, 300
Fígado
aspirados, 212
extrato de, 454
solução de infuso de, 438
Filariose(s), 355-372
diagnóstico laboratorial, 356
exame a fresco do sangue, 357
esfregaços sangüíneos espessos e corados, 357
preparação, 358
método da contagem em câmara, 359
procedimento, 359
métodos de coloração, 359
de Giemsa, 359
características, 360
hematoxilina de Bohmer, 366
preparação das soluções, 366
reagentes, 366
hematoxilina de Carrazzi, 367
hematoxilina de Delafield segundo Ash e Orihel, 360
controle de qualidade, 362
preparação do corante, 360
preparação dos esfregaços, 361
hematoxilina de Delafield, 360
hematoxilina de Harris, segundo Mallory, 363
controle de qualidade, 364
preparação do corante, 363
procedimento, 364
hematoxilina de Mayer, 364
coloração da amostra, 365
preparação do corante, 365
reagentes, 364
métodos e técnicas de concentração, 367
biópsia cutânea, 369
procedimento, 369
reagentes, 369
método da membrana-filtrante, 369

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

técnica de Knott, 368
amostra, 368
controle de qualidade, 368
reagentes, 368
técnica, 368
pela *Mansonella ozzardi*, 356
pela *Onchocerca volvulus*, 357
pela *Wuchereria bancrofti*, 356
Filariose bancroftiana, diagnóstico laboratorial da, 373-394
considerações
clínicas, 374
gerais, 373
diagnóstico de laboratório, 375
coloração pela hematoxilina, segundo Carrazzi, 382
biópsia, 385
coloração, 384
fixação, 383
periodicidade, 384
pesquisa de verme adulto, 385
preparação do corante, 383
reagentes, 382
teste provocativo com DEC, 384
ultra-sonografia, 385
diagnóstico sorológico, 386
outros exames, 388
clearance de creatinina, 390
contagem absoluta de eosinófilos, 388
contagem de Addis, 389
linfocintigrafia, 390
parasitológico das fezes, 388
pesquisa de linfócitos, 389
proteinúria de 24 horas, 390
sumário de urina, 389
pesquisa de microfilária, 377
reação em cadeia da polimerase, 387
epidemiologia, 374
Filtro(s)
bacteriológico *Millipore*, 194
HEPA, 614, 627
Millipore, 726
Nuclepore, 384
Fita de celofane adesiva e transparente, método da, na pesquisa de *Enterobius vermicularis*, 166
amostra e colheita, 166
controle de qualidade, 167
observações, 167
preparação e método, 166
reagentes, 166
Fitoparasitos, 142
Fixador(es)
acetato de sódio-ácido acético-formaldeído, 20, 268
desvantagens, 21
vantagens, 21
álcool polivinílico, 14, 587
desvantagens, 17
modificado, 17
desvantagens, 18
vantagens, 18
vantagens, 17
APV, 172, 208
de Bouin, 562
de Schaudinn, 11, 208, 581, 587
desvantagens, 13
modificado, 13
vantagens, 13
fenol-álcool-formaldeído, 23
mertiolato-iodo-formaldeído, 18
desvantagens, 20
vantagens, 20
Fixadores/preservadores, 735-739
álcool
formaldeído-ácido acético, 735
glicerinado, 735
de Blé, 736
de Carnoy, 739
de Gilson, 738
de Hollande, 739
de Looss, 737
de Travassos, 736
de Zenker, 738
formaldeído, 737
líquido de Bouin ou picroformaldeído, 736
solução de Bayer, 739
Flagelados intestinais, 679
Chilomastix mesnili, 679
cistos, 680
trofozoítos, 679
Dientamoeba fragilis, 682
trofozoítos, 682
Enteromonas hominis, 682
cistos, 682
trofozoítos, 682
Giardia lamblia, 680
cistos, 681
trofozoítos, 680
Retortamonas intestinalis, 682
cistos, 682
trofozoítos, 682
Flebotomíneos, 325
Flebótomo, 523
Flictenas, 521
Fluido cerebroespinhal, 357
Fluoresceína, 500
isotiocianato de, 514
Fluorescense Polarization Immunoassay, 499
Fluorimetria, ensaios de, 514
Fluorocromos, 514
colorações pelos, 256
métodos de coloração pelos, 226
Fluoroslide, 657
Fluotitas, 643
Formaldeído, 273, 737
solução de, 9, 562
não tamponada, 11
salina, 10, 562
tamponada, 10, 562
desvantagens, 11
vantagens, 11
Formaldeído-éter modificado, 74
Formalina-acetato de etila, 61
Formalina-éter, 61
Formol, 321
Fosfato(s)
de Sörensen, solução tampão de, 189

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

solução tampão de, 209
tampão de, 444
Fotomicrografia, 643
Frasco tipo Erlenmeyer, 130, 475
Freezer, 617
controle de qualidade, 617
manutenção preventiva, 617
Frio, larvas sensíveis ao, 117
Fuchsin-carbol, corante, 233
Fucsina ácida-*fast green*, 84, 729
Fucsina básica, 230
Fucsina-fenicada, método de coloração pela, 243
amostra, 243
características da coloração, 244
coloração da amostra, 244
reagentes, 243
Fungemia, 149
Fungos, proliferação de, 252
Funil
de Baermann, 179
de Buchner, 133, 408

G

Gama-glutamiltransferase, níveis de, 533
Gametócitos, 346
Gastrenterite transitória, 666
Gel de agarose, 545
Geladeira, 616
controle de qualidade, 617
manutenção preventiva e cuidados técnicos, 616
Gelatina de glicerina, 740
Gelysate, 422
Genetic System, 657
Gentamicina, 448
Giardia duodenalis, 430, 681
Giardia lamblia, 218, 429-434, 680
cistos, 681
meio de Keister, 432
amostra, 432
controle de qualidade, 433
meio de cultura, 432
reagentes, 432
meio *Trypticase-Yeast Extract-Iron-Serum* modificado, 430
amostra, 430
meio de cultura, 431
preparação, 431
reagentes, 430
ovos de, 155
trofozoítos, 680
Giemsa, coloração de, 74, 196, 260, 296, 359, 657
amostra, 260
características da coloração, 197, 260
coloração, 298
da amostra, 196
controle de qualidade, 197, 299
observações, 196, 260
preparação do corante, 296
reagentes e preparação, 196
Gilson, fixador de, 738
Glândulas
de Bartholin, 179
vestibulares, 185
Glicerina, 11, 249, 296, 360
gelatina de, 740
Glicogênio, 40
Glicose, solução de, 439
Golgi, aparelho de, 650
Gomori, coloração de, 84
GRAM, método de coloração de, 256
Gram-*Chromotrope*, 148, 248, 280
Granulações
de Maurer, 296, 690
de Schüffner, 296
de Ziemann, 691
Grânulos eosinofílicos, 304
Grãos de pólen, 143
Grey-Wess, meio de montagem de, 740

H

Hanks (HBSS) e Earle (EBSS), solução de, 486
Harada-Mori, método de, 126
Harris, hematoxilina de, 182, 571
Hartmanella hyalina, 146
Heidenhain, coloração de, 94
Heine, método de coloração de, 242
amostra, 242
características da coloração, 242
coloração da amostra, 242
observações, 243
reagentes, 242
Helmintos, 148, 528
cisticercose, 528
diagnóstico dos, 696
do sangue e dos tecidos, 604
esquistossomose mansônica, 530
exame direto para a pesquisa de ovos de, 47
método do esfregaço espesso de celofane, 47
hidatidose, 531
intestinais, 604
larvas de, 148
microfilárias, 149
ovos de, 148
preparações permanentes para ovos e larvas de, 733-735
cestóides, 734
nematóides, 734
trematódeos, 735
toxocaríase, 533
vermes adultos, 148
Hemácias, 151
Hemaglutinação indireta, 178
Hematofagia, 374
Hematoquilúria, 390
Hematoxilina
ácida de Ehrlich, 730
de Bohmer, coloração pela, 366
preparação das soluções, 366

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

reagentes, 366
de Carrazzi, 381
coloração pela, 367
fixação, 383
preparação do corante, 383
reagentes, 382
de Delafield segundo Ash e Orihel, coloração pela, 360
controle de qualidade, 362
preparação
do corante, 360
dos esfregaços, 361
de Harris, 571
segundo Mallory, coloração pela, 182, 363
controle de qualidade, 364
preparação do corante, 363
procedimento, 364
de Mayer, coloração pela, 364
coloração da amostra, 365
preparação do corante, 365
reagentes, 364
e eosina, protocolo básico para coloração com, 572
Hematoxilina
modificada por Burrows, 85
amostra, 85
coloração da amostra, 87
observações, 88
preparação das soluções, 87
reagentes, 86
modificada por Melvin e Brooke (FNP), 88
amostra, 88
coloração da amostra, 90
preparações das soluções, 89
reagentes, 88
modificada por Melvin e Brooke (FP), 91
amostra, 91
coloração da amostra, 93
preparações das soluções, 92
reagentes, 91
Hematoxilina férrica, coloração pela
amostra, 249
características da coloração, 253
coloração da amostra, 252
controle de qualidade, 254
preparação das soluções, 250
reagentes, 249
Hematoxilina férrica-ácido
clorídrico, coloração pela, 97
amostra, 97
características da coloração, 99
coloração da amostra, 98
controle de qualidade, 99
preparações das soluções, 97
reagentes, 97
fosfotúngstico, coloração pela, 94
amostra, 94
características da coloração, 96
coloração da amostra, 96
preparação das soluções, 95
reagentes, 94
Hemina, solução de, 438
Hemocultura, 316
Hemoglobina, 321
Hemolinfa, 316
Hemolisina, 498
Henriksen, métodos de, 74
Henriksen-Pohlenz
derivados de, 241
método de coloração de, 230, 590
amostra, 230
características da coloração, 231
coloração da amostra, 231
observações, 231
preparação das soluções, 230
reagentes, 230
HEPA, filtro, 614, 627
Heparina, 321, 449
solução de, 729
Hepatoglobulinemia, 349
Heterodera, 142
marioni, 145
Hidatidose, 506, 531
Hidrato de cloral, 365, 740
Hidrocele, 375
Hidrogênio, peróxido de, 208
Hidrogenocarbonato
de potássio, 455
de sódio, 278, 455, 737
Hidrogenofosfato
dipotássico, 455
anidro, 432
dissódico, 9
anidro, 189, 296, 419, 439
diidratado, 296
Hidrogenossulfito de sódio, 658
Hidróxido
de amônio, solução de, 360
de potássio, 76
de sódio, 600, 742
solução de, 208
Hipergamaglobulinemia, 524
Hipersensibilidade
tipo III, 506
testes de
imediata, 520
tardia, 520
Hipoglicemia, 335
Hipoparasitemia, 693
Hipoxantina, 448
Histologia, técnicas de rotina em, 559-576
coloração, 570
corantes, 571
hematoxilina de Harris, 571
solução de eosina a 1%, 571
congelação, 563
considerações gerais, 559
cortes, 567
fixação, 560
fixadores, 561

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

soluções, 562
de formaldeído a 10%, 562
fixador de Bouin, 562
salina de formaldeído a 10%, 562
tamponada de formaldeído a 10%, 562
inclusão em meio sódio, 564
montagem, 572
processamento de tecidos, 562
protocolo
básico
para coloração com hematoxilina e eosina, 572
para inclusão em parafina, 567
geral de preparo de lâminas histológicas, 560
tipos de fixação, 560
para montagem de lâminas permanentes, 573
recomendações gerais, 573
HIV, vírus, 74, 265, 581, 668
infecção pelo, 506
Hoffman-Pons-Janer, técnica de, 58
Hollande, fixador de, 739
Hormônios, dosagem de, 516
Howell-Joly, corpos de, 149
Hoyer, meio de, 740
Humor aquoso, 519
intra-ocular, 526
Hunter, técnica de, 58
Hymenolepis nana, 29, 73

I

ICT Malaria PF/PV e OpitMAL, 342
IgA, 511, 527
anti-*Toxoplasma*, 526
IgD, 511
IgE, 511, 521
testes imunológicos, específicos, 511
IgG materna, 510
IgG, 510, 521
IgM, 510, 521
moléculas de, 513
Iluminação Köhler, 646
Imunidade celular, teste de, 521
Imunoblot, método de, 516
Imunocitoquímica, 500
Imunocomplexos, formação de, 506
Imunodifusão, 178
radial
dupla, 494
simples, 494
Imunoeletroforese, 178, 494
Imunoeletrotransferência, técnicas de, 503
Western Blotting, 503
Imunofixação, 495
Imunofluorescência, 178
direta, 499
indireta, 500
método de, 514
direta, 515
indireta, 515
Imunoglobulinas/anticorpos, 510
IgA, 511
IgD, 511
IgE, 511
IgG, 510
IgM, 510
Imunologia das parasitoses, 505
Imunoperoxidase, 500
Infecção(ões)
chagásica humana, 319
espúrias, 142
pelo HIV, 506
Infecções parasitárias
biologia molecular aplicada às, 508
marcadores imunológicos no diagnóstico de algumas, 521
helmintos, 528
cisticercose, 528
esquistossomose mansônica, 530
hidatidose, 531
toxocaríase, 533
protozoários, 521
amebíase, 521
doença de Chagas, 522
leishmaniose, 523
toxoplasmose, 525
testes imunológicos nas, 518
ciclo biológico, 519
cinética da produção de anticorpos e perfil imunológico da infecção, 520
escolha do material biológico e conservação da amostra a ser examinada, 519
hospedeiro humano, 519
intensidade e localização do parasitismo, 519
mecanismos de evasão parasitária, 519
papel da resposta imune, 520
parâmetros do método imunodiagnóstico, 520
relação parasito/hospedeiro, 519
Infiltrado pulmonar, 656
Inibição da hemaglutinação, reação de, 497
Injeção de tinta da China, 32
Inositol, 400
*InPouch*TV™, meio de cultura, 466
Insetos, larvas de, 152
Interferon, 521
Interleucinas, 520
Iodamoeba, 41, 674
bütschlii, 678
cistos, 678
trofozoítos, 678
Iodeto
de potássio, 19, 277, 383
de propídio, 256
Iodo, 256, 277
soluções de, 38, 40, 588
coloração pela, de D'Antoni, 195
coloração da amostra, 195
modificada, 39
preparações fixadas e coradas, 195
reagentes, 195
de Dobell e O'Connor, 39

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

de Lugol, 38, 208
de mertiolato-iodo-formaldeído, 46
de Quensel, 41
tamponada de azul-de-metileno de Nair, 43
Iodo-xilol, 166
Isospora, 591
belli, 147, 229, 685
oocistos, 685
imaturos de, 237
Isotiocianato de fluoresceína, 514
Ivermectina, 389

J

Jahnes-Hodges, técnica de, 58
Johnson-Trussell, meios de cultura de, 198

K

Kato e Miura, método de, 48
Kato-Katz, método de, 134
amostra, 135
cálculo, 136
material, 135
método, 136
observações, 136
reagentes, 135
solução aquosa glicerinada de verde de malaquita, 135
Keister, meio de, 430, 432
amostra, 432
controle de qualidade, 433
meio de cultura, 432
reagentes, 432
Kinyoun, método de coloração de, 232, 255
amostra, 232
características da coloração, 234, 260
coloração da amostra, 233, 259
controle de qualidade, 234
observações, 234
preparação das soluções, 232, 256
reagentes, 232, 256
Knott, técnica de, 306, 368, 597
amostra, 368
controle de qualidade, 368
reagentes, 368
técnica, 368
Köhler, iluminação, 646
Kohn
corante de, 256
solução, 38
de fenol de, 108
amostra, 109
coloração da amostra, 109
observações, 109
reagentes, 109
Kulda, meios de cultura de, 198
Kupferberg-Johnson-Sprince, meios de cultura de, 198

L

La Fuente, procedimento de, 310
Laboratórios de parasitologia, biossegurança em, 623-638
boas práticas de laboratório, 635
capelas de segurança biológica, 627
classificação dos microrganismos por classe de risco, 630
conceito e importância da biossegurança, 624
descontaminação do material de trabalho, 634
equipamento de proteção, 626
laboratórios clínicos, 626
níveis de biossegurança, 625
parasitos, 631
cestóides, 633
nematóides, 633
protozoários, 632
trematódeos, 634
Lamblia intestinalis, 681
Lâmina(s)
de microscopia, 40
histológicas, protocolo geral de preparo de, 560
tipos de fixação, 560
Lâmpada ultravioleta, 616
Larva(s)
de helmintos, 148
de insetos, 152
de *Strongyloides stercoralis*, 156, 388
migrans visceral, síndrome de, 533
rabditóides, 115
sensíveis ao frio, 117
Larvas nematóides, isolamento e cultura de, 115-128
considerações gerais, 115
em carvão, 123
amostra, 123
método, 123
observações, 124
reagentes, 123
método
de Arakaki-Koga, 126
de Baermann-Moraes, 116
amostra, 116
aparelho, 116
observações, 117
de Harada-Mori, 126
de Rugal-Mattos-Brisola, 117
amostra, 117
observações, 118
no papel-filtro
em placa de Petri, 121
amostra, 121
método, 121
observações, 122
em tubo de ensaio, 119
amostra, 119
método, 119
observações, 119
Strongyloides stercoralis em placa de Ágar, 124

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

amostra, 125
meio de cultura, 125
método, 125
observações, 126
reagentes, 125
L-aspartato, 444
Lavado
broncoalveolar, 657
colheita de, 212
brônquico-alveolar, 526
nasal, 482
prepucial, 185
Laxantes, 7
L-cisteína, 430
Lecitina, 497
Leishman
coloração de, 301
coloração, 302
preparação do corante, 302
reagentes, 302
métodos de, 190
Leishmania
amazonensis, 325
brasiliensis, 523
donovani, 218, 291
guyanensis, 325
major, 523
mexicana, 326, 523
panamensis, 325
peruviana, 326
tropica, 523
Leishmania spp., 218, 319, 435-446, 689
amastigota, 689
cepas-padrão, 436
meios de cultura, 437
Brain Heart Infusion, 442
observação, 443
preparação, 442
reagentes, 442
completo, 440
de Schneider, 443
Liver infusion tryptose, 438
preparação, 438
reagentes, 438
MacNeal, Novy e Nicolle, 441
observações, 442
preparação, 441
reagentes, 441
Triatomine Artificial Urine, 443, 444
promastigota, 689
reagentes, 436
Leishmaniose(s), 325-332, 523
cutânea, 213
difusa, 213
cutaneomucosa, 213
métodos parasitológicos, 326
cultura, 327
esfregaço corado, 326
histopatologia, 327
inoculação em animais, 328
obtenção do material, 326
tegumentar americana, 213
visceral, 328
métodos imunológicos, 328
intradermorreação de Montenegro, 328
reação de imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático, 329
métodos moleculares, 329
reação em cadeia da polimerase, 329
Lembus pusillus, 147
Lentes de contato, 418
solução para, 421
Lesão(ões)
capilar por deposição de imunocomplexos, 334
na retina, 515
ulceradas da córnea, 417
Leucócitos, 304
mononucleares, 94
polimorfonucleares, 94
Levedo, extrato de, 422, 454
Levedo-glicose, meio proteose peptone- extrato de, para acanthamoeba, 422
Leveduras, células de, 151
L-glutamato de sódio, 444
L-glutamina, 449
Ligantes, uso de, 514
Light green, 103, 256
Linfangiectasia, 386
Linfáticos intra-escrotais, 386
Linfedema crônico da elefantíase, 374
Linfocintigrafia, 390
Linfócitos, 151
B, 511, 520
pesquisa de, 389
T, 509
T-*helper* 2, 520
Líquido(s)
amniótico, 526
cefalorraquidiano, 420, 519
aspirados, 214
colhido por aspiração, 215
de Bouin, 736
de Schaudinn, 8, 172
duodenal, estudo do, 211
orgânicos, artefatos dos, 149
quilocélico, 377
Lisamina-rodamina, 514
Liver infusion Broth, 438
Liver Infusion Tryptose, 327
meio de cultura, 438
preparação, 438
reagentes, 438
Loa loa, 183, 356, 373
Locke, soluções de, 188, 651
Loeffler, síndrome de, 207
Looss, fixador de, 737
Loughlin-Spitz, técnica de, 58
Loughlin-Stoll, técnica de, 58
Lowe, meio de cultura de, 461
básico, 461
completo, 462
preparação, 462
Lugol, solução de, 38, 680
iodo de, 19, 208

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Lutz, técnica de, 58
Luz ultravioleta, 615

M

Macaco, células de rim de, 481
MacNeal-Novy-Nicolle, meios de cultura, 441
  observações, 442
  preparação, 441
  reagentes, 441
Macrófagos, 150
Macrogameta, 336
Magnésio
  cloreto de, 444, 547
  sulfato de, 422, 741
    solução de, 53
Malaquita, verde de, 230
  solução aquosa de, 48, 231
    glicerinada, 135
Malária, 149
  grave, 334
  parasitos da, 690
Mansonella, 183
  ozzardi, 291, 373, 708
    filarioses pela, 356
    microfilárias, 710
    vermes adultos, 708
  perstans, 356, 373
  streptocerca, 215, 218, 373
Marcadores
  enzimáticos, ensaio com, 501
    ELISA com captura de IgM, 502
    enzimaimunoensaio, 501
      com micropartículas, 503
      Enzyme Multiplied Immunoassay Technique, 502
      Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 502
  fluorescentes, ensaios com, 498
    sistema avidina-biotina, 500
    testes fluorescentes heterogêneos, 499
      de modulação direta, 499
      de modulação dupla, 499
      de modulação indireta, 499
      imunofluorescência direta, 499
      imunofluorescência indireta, 500
  imunológicos no diagnóstico de algumas infecções parasitárias, 521
    helmintos, 528
      cisticercose, 528
      esquistossomose mansônica, 530
      hidatidose, 531
      toxocaríase, 533
    protozoários, 521
      amebíase, 521
      doença de Chagas, 522
      leishmaniose, 523
      toxoplasmose, 525
  radioativos, ensaios com, 501
    radioimunoensaio, 501
      radioallergosorbent test, 501
      tumorais, 516
Massagem prostática, 186
Material(is)
  biológicos contaminados, 616
  de abscessos da pele, 418
  de sigmoidoscopia
    esfregaços permanentes corados, 176
      amostra e colheita, 176
      controle de qualidade, 177
      método, 177
      observações, 178
      reagentes, 177
    exame direto a fresco, 174
      amostra e colheira, 175
      controle de qualidade, 175
      método, 175
      observações, 176
      reagentes, 175
  fecal
    consistência do, 28
    preservado, 60
  genético, 508
  pulmonar, 211
  vaginal, colheita de, com *swab* de algodão não absorvente com o auxílio de um espéculo não lubrificado, 186
Maurer, granulações de, 296, 690
Mayer, albumina fixadora de, 251, 252
MDCK, 481
Medula óssea, aspirados, 212
Meio de cultura
  Biosate Peptone, 431
  CMRL 1055 modificado, 198
  CPLM, 198
  de Balamuth, 408
    inoculação, 409
    preparação, 408
    reagentes, 408
    solução
      concentrada de fígado, 408
      tampão de fosfato, 408
  de Boeck and Drbohlav *Locke-Egg-Serm*, 409
    completo, 410
    controle de qualidade, 411
    reagentes, 409
  de Grey-Wess, 740
  de Hoyer, 740
  de Keister, 430, 432
    amostra, 432
    controle de qualidade, 433
    reagentes, 432
  de Robinson, 411
    cultivo xênico, 411
  de Trager-Jensen, 448
    implantação, 449
    manutenção, 450
    preparação das hemácias normais para renovação da cultura, 449
    reagentes, 448
    RPMI completo, 449
  LIT, 327
  NNN, 327
  STS, 198

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Trypticase-Panmede Liver-Digest-Serum, 429
Trypticase-Yeast Extract-Iron-Serum, 398
completo, 401
cultivo axênico, 398
amostra, 398
caldo nutritivo, 399
preparação, 399
reagentes, 398
inoculação e cultivo, 401
mistura de vitaminas, 399
modificado, 430, 431
amostra, 430
preparação, 431
reagentes, 430
Trypticase-Yeast Extract-Serum-Gastric Mucin, 402
cultivo xênico, 402
amido de arroz, 403
caldo nutritivo, 403
reagentes, 402
solução de Tween, 403
solução estoque de antibióticos, 404
solução tamponada de azul-de-metileno, 404
solução tamponada de fosfato pH 7, 2, 403
suspensão de amido de arroz, 404
TTYS-CEEC, 474
básico, 475
completo, 477
extrato
cru de embrião de galinha a 25%, 475
de vitaminas NCTC 107 modificada, 476
reagentes, 474
TYM, 198
modificado por Hollander, 198
Meloidogyne sp., 142, 145
Membrana(s)
filtrante *Nuclepore*, 183
Transwell, 483
Meningite
eosinofílica, 215
etiologia da, 215
Meningoencefalite, 214
amebiana, 214
primária, 417
Mepacrine, 256
Merbromine, 256
Mercúrio
cloreto de, 738
solução aquosa saturada de, 11
óxido de, 363
Merifluor, 657
Meronte, micrografia eletrônica mostrando, em divisão, 482
Merozoíto, 336
Mertiolato, tintura de, 19, 46, 249
Mertiolato-iodo-formaldeído, 18
solução de, 46
Metabissulfito de potássio, 658
Metagonimus yokogawai, 49
Metanol, 326
Metenamina, 658
Método(s) (v.t. Técnica)
coprológicos quantitativos específicos para o diagnóstico do *Schistosoma mansoni*, 132
da cápsula duodenal, 594
no exame do aspirado duodenal, 170
colheita da amostra, 171
controle de qualidade, 172
observações, 1723
procedimento, 172
reagentes, 171
da contagem em câmara, 359
da fita de celofane adesiva e transparente na pesquisa de *Enterobius vermicularis*, 166
amostra e colheita, 166
controle de qualidade, 167
observações, 167
preparação, 166
reagentes, 166
da imunoperoxidase, 503
da membrana filtrante, 310, 369, 598
da tinta da China, 32
de Arakaki-Little, 126
de Baermann, 354
de Baermann-Morais, 116
amostra, 116
aparelho, 116
observações, 117
de Barbosa, 134
de Bell, 133
amostra, 133
aparelho de Bell, 133
de Brooke, 102
amostra, 102
características da coloração, 104
coloração da amostra, 103
observações, 104
preparação das soluções, 102
reagentes, 102
de Budzko-Kierszanbaum, 310
de Campos, 31
coloração pelo, 31
de centrifugação tríplice, 307
amostra, 307
controle de qualidade, 308
reagentes, 307
de coloração, 229, 359
de coloração da safranina, 590
rápido, 244
amostra, 244
características da coloração, 245
coloração da amostra, 245
observações, 245
preparação das soluções, 244
reagentes, 244
de coloração da safranina, modificado, 237, 245
amostra, 238
características de coloração, 239
coloração da amostra, 238
controle de qualidade, 239
de oocistos de *Cryptosporidium*

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

parvum, 248
amostra, 248
coloração da amostra, 249
observações, 247
reagentes, 248
soluções, 248
de oocistos de *Cyclospora cayetanensis*, 245
amostra, 246
características da coloração, 247
coloração da amostra, 246
reagentes, 246
soluções, 246
preparação das soluções, 238
reagentes, 238
de coloração de Giemsa, 74, 260, 359, 657
amostra, 260
características, 260, 360
observações, 260
de coloração de Heine, 242
amostra, 242
características da coloração, 242
coloração da amostra, 242
observações, 243
reagentes, 242
de coloração de Henriksen-Pohlenz, 230, 590
amostra, 230
características da coloração, 231
coloração da amostra, 231
observações, 231
preparação das soluções, 230
reagentes, 230
de coloração de Kinyoun, modificado, 232, 255
amostra, 232
características da coloração, 234, 260
coloração da amostra, 233, 259
controle de qualidade, 234
observações, 234
preparação das soluções, 232, 256
reagentes, 232, 256
de coloração de Ziehl-Neelsen modificado, 235, 590
amostra, 235
características da coloração, 237
coloração da amostra, 236
observações, 237
preparações das soluções, 236
reagentes, 235
de coloração de Ziehl-Neelsen-Dimetilsulfóxido, modificado, 239
amostra, 239
características da coloração, 241
controle de qualidade, 241
reagentes, 239
de coloração negativa pela fucsina-fenicada, 243
amostra, 243
características da coloração, 244
coloração da amostra, 244
reagentes, 243
de coloração para microsporídios intestinais, 265-288
pelo *Chromotrope*, 283
características da coloração, 284
coloração da amostra, 284
controle de qualidade, 284
preparação das soluções, 283
reagentes, 283
pelo *Chromotrope* (Weber-verde), 268
amostra, 268
características da coloração, 271
coloração da amostra, 270
preparação das soluções, 269
reagentes, 268
pelo *Chromotrope* a quente ou modificação de Kokoskin, 275
amostra, 275
características da coloração, 277
coloração da amostra, 276
preparação das soluções, 275
reagentes, 275
pelo *Chromotrope* ou modificação de Ryan, 271
amostra, 271
características da coloração, 274
coloração da amostra, 273
preparação das soluções, 272
reagentes, 271
pelo Gram-*Chromotrope*, 277
amostra, 277
características da coloração, 280
coloração da amostra, 279
controle de qualidade, 280
preparação das soluções, 277
reagentes, 277
pelo Gram-*Chromotrope*, rápida a quente, 280
amostra, 280
características da coloração, 283
coloração da amostra, 282
preparação das soluções, 281
reagentes, 280
pelo tricrômio modificado (Weber-verde-Ryan-azul), 274
controle de qualidade, 274
de coloração pela hematoxilina de Bohmer, 366
preparação das soluções, 366
reagentes, 366
de coloração pela hematoxilina de Carrazzi, 367
de coloração pela hematoxilina de Delafield segundo Ash e Orihel, 360
controle de qualidade, 362
preparação
do corante, 360
dos esfregaços, 361
de coloração pela hematoxilina de Harris, segundo Mallory, 363
controle de qualidade, 364
preparação do corante, 363
procedimento, 364
de coloração pela hematoxilina de Mayer, 364
coloração da amostra, 365

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

preparação do corante, 365
reagentes, 364
de coloração pela hematoxilina férrica modificada, 249
amostra, 249
características da coloração, 253
coloração da amostra, 252
controle de qualidade, 254
preparação das soluções, 250
reagentes, 249
de coloração pela prata, rápida, 658
amostras, 658
coloração da amostra, 660
controle de qualidade, 661
preparação das soluções, 659
reagentes, 658
de coloração *Vaginal Identification of Pathogens*, 194
de Harada-Mori, 126
de Henriksen, 74
de imunofluorescência, 514
direta, 515
indireta, 515
de Kato-Katz, 134, 136
amostra, 135
cálculo, 136
material, 135
observações, 136
reagentes, 135
solução aquosa glicerinada de verde de malaquita, 135
de Kato-Miura, 48
de Leishman, 190
de Pohlenz, 74
de quimioluminescência, 516
de radioimunoensaio, 516
de Rohwedder, 310
de Rugai-Mattos-Brisola, 117, 118
amostra, 117
observações, 118
de Stoll modificado, 132
reagentes, 132
de Stoll-Hausheer, 130, 131
amostra, 130
observações, 131
reagentes, 130
de Teesdale-Amin, 137
de Weber, 268
de Weber-Ryan, 591
de *Western* ou *Imunoblot*, 516
de Wheatley, 100
amostra, 100
coloração da amostra, 101
preparação das soluções, 101
reagentes, 100
de Yang-Scholten, 105
amostra, 105
coloração da amostra, 106
controle de qualidade, 106
corante tricrômico, segundo Garcia e Bruckner, 105
preparação
da amostra, 106
das soluções, 105
reagentes, 105
do ácido acético glacial, 31
do esfregaço espesso de celofane, 47
do *Swab* de vaselina e parafina na pesquisa de *Enterobius vermicularis*, 169
amostra e colheita, 169
controle de qualidade, 169
observações, 170
preparação, 169
reagentes, 169
imunoenzimáticos, 516
moleculares no diagnóstico das parasitoses humanas, 543-556
reação em cadeia da polimerase, 544
deoxinucleotídeos trifosfatados, 547
dosagem de DNA, 545
extração de DNA, 545
iniciadores, 546
reação, 548
tampão, 547
taq DNA polimerase, 547
termocicladores, 548
visualização dos resultados, 549
aplicações práticas, 550
cuidados com as contaminações, 552
genes de interesse, 552
Metoquina, 31
Microfilária(s), 149
com bainha, 159
de *Mansonella ozzardi*, 710
de *Onchocerca volvulus*, 710
de *Wuchereria bancrofti*, 708
pesquisa de, 377
sem bainha, 159
técnicas para identificação da espécie de, 380
Microgameta, 336
Micrômetro ocular, 70, 107, 167, 584, 646
Microscopia
de contraste de fase, 74
lâmina de, 40
óptica, 641-648
considerações gerais, 641
iluminação Köhler, 646
morfometria feita com micrômetro ocular, 646
óptica, componentes do microscópio óptico, 642
condensador, 642
poder de resolução, 642
fonte luminosa, 642
objetivas, 643
abertura numérica, 644
de imersão, 644
uso de lamínula com espessura correta, 644
oculares, 645
aumento final dado pelo microscópio, 645
platina, 642
de fluorescência pela luz ultravioleta
de contraste de fase ou do contraste diferencial de interferência (DIC ou Nomarski)

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Microscópio
de fundo claro, 244
óptico, 619, 620
controle de qualidade, 619
manutenção preventiva, 619
Microsporídios, 147, 218, 479-490, 667
armazenamento e transporte das amostras, 486
concentração e purificação de esporos, 485
considerações gerais, 479
criopreservação, 486
cultivo de microsporídios em culturas celulares, 481
cultura de células, 481
metodologia das culturas celulares inoculadas, 484
processamento das amostras biológicas nas culturas celulares, 482
intestinais, métodos de coloração para, 265-288
pelo *Chromotrope*, 283
a quente ou modificação de Kokoskin, 275
ou modificação de Ryan, 271
pelo *Chromotrope* (Weber-verde), 268
pelo Gram-*Chromotrope*, 277
rápida e quente, 280
pelo tricrômio modificado (Weber-verde e Ryan-azul)
Microtiter plate, 483
Micrótomo
de deslize, 568
rotativo, 569
MIF
corante-fixador, 47
solução fixadora, 66
Millipore, filtro, 726
Moererastrongylus costaricensis, 351
Mohr, pinça de, 116
Moléculas
de IgM, 513
inorgânicas, 509
Montenegro, intradermorreação de, 328
Morfometria, 173
feita com micrômetro ocular, 646
MRC-5, 481
Mucosa
da bexiga, 217
do trato intestinal, 226
nasal, 214
uretral, 185, 464
Músculo, biópsia de, 482
Musselina, saco de, 409

N

Naegleria
gruberi, 146
fowleri, 214
meio modificado de Nelson para, 423
preparação, 424
reagentes, 423
Naegleriase, 424
Nair
azul-de-metileno de, 43
solução de, 585
coloração de, 38
National Bureau of Standards, 613
Necator americanus, 705
ovos, 706
vermes adultos, 705
Nefelometria, 495
Nelson, meio,
NNN, meio (MacNeal, Novy e Nicolle),
Nomarski, (microscopia de contraste de fase ou do contraste diferencial de interferência)
Nematóides, 669, 734
do sangue e dos tecidos, 670, 708
Angiostrongylus costaricensis, 710
vermes adultos, 710
Mansonella ozzardi, 708
microfilárias, 710
vermes adultos, 708
Onchocerca volvulus, 710
microfilárias, 710
vermes adultos, 710
Wuchereria bancrofti, 708
microfilárias, 708
vermes adultos, 708
dos tecidos, 670
intestinais, 669, 702
Ancilostomídeos, ovos de, 706
Ancylostoma duodenale, 704
ovos, 705
vermes adultos, 704
Ascaris lumbricoides, 702
ovos, 702
vermes adultos, 702
Capillaria philippinensis, 703
ovos, 703
vermes adultos, 703
Enterobius vermicularis, 703
ovos, 704
vermes adultos, 703
Necator americanus, 705
ovos, 706
vermes adultos, 705
Strongyloides stercoralis, 707
larvas filarióides, 707
larvas rabtidóides, 707
Trichuris trichiura, 702
ovos, 703
vermes adultos, 702
Neutrófilos polimorfonucleares, 158
Niacinamida, 476
Nicotinamida, 400
Nigrosina, 256
Ninhidrina, solução saturada de, 133
Nitrato de prata, 658
Nitrato de prata-metenamina, 657
Nitrocelulose, 330
Nitrogênio líquido, 451, 486

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Nódulos linfáticos, aspirado de, 212
exame do, 213
Nosema corneum, 480
Nucleophaga spp., 147

O

Onchocerca volvulus, 215, 218, 373, 710
filarioses pela, 357
microfilárias, 710
vermes adultos, 710
Oocineto, 339
Oocistos, 339
de *Cryptosporidium parvum*, 225
método de coloração da safranina de, 248
amostra, 248
coloração da amostra, 249
observações, 247
reagentes, 248
soluções, 248
de *Cryptosporidium* spp., 72
de *Cyclospora*, 685
de *Cyclospora cayetanensis*, 72
método de coloração da safranina de, 245
amostra, 246
características da coloração, 247
coloração da amostra, 246
reagentes, 246
soluções, 246
imaturos de *Isospora*, 237
Opisthorchis viverrini,
Opsonina, 510
Organismos biflagelados, 424
Organismos parasitos, artefatos que podem ser confundidos com, 141-154
considerações gerais, 141
elementos derivados de contaminação externa
artefatos dos líquidos orgânicos, 149
células humanas, 149
eosinófilos, 151
hemácias, 151
linfócitos, 151
macrófagos, 150
polimorfonucleares, 149
coccídios, 147
Cryptosporidium spp., 147
Isospora belli, 147
leishmania, 148
microsporídios, 147
Trypanosoma, 148
cristais de Charcot-Leyden, 151
Helmintos, 148
larvas de, 148
microfilárias, 149
ovos de, 148
vermes adultos, 148
infecções espúrias, 152
larvas de insetos, 152
não-humanos encontrados nas fezes, 151
protozoários, 143
amebas, 143
ciliados, 147
flagelados, 147
sangue, 149
elementos em trânsito, 142
Organização Mundial da Saúde, 325
Oryzomys nigripes, 351
Oshima, técnica de, 58
Ouchterlony, técnica de, 494
Ouvidos
secreção dos, 420
supuração dos, 418
Ovo(s)
Ancilostomídeos, 706
Ancylostoma duodenale, 703
Ascaris lumbricoides, 155, 702
Capillaria philippinensis, 703
Echinococcus granulosus, 714
Enterobius vermicularis, 578, 703
Fasciola hepatica, 717
galinha, claras de, 249
helmintos, 148
exame direto para a pesquisa de, 47
método do esfregaço espesso de celofane, 47
Hymenolepis
diminuta, 713
nana, 713
Necator americanus, 703
Schistosoma mansoni, 715
Taenia
saginata, 712
solium, 712
Trichostrongylus orientalis, 706
Trichuris, 697
trichiura, 703
zooparasitos, 142
Ovo(s) nas fezes, demonstração e quantificação de, 129-140
considerações gerais, 129
método
coprológicos quantitativos específicos para o diagnóstico do *Schistosoma mansoni*, 132
de Barbosa, 134
de Bell, 133
amostra, 133
aparelho de Bell, 133
método, 133
de Kato-Katz, 134
amostra, 135
cálculo, 136
material, 135
método, 136
observações, 136
reagentes, 135
solução aquosa glicerinada de verde de malaquita, 135
de Stoll modificado, 132
método, 132
reagentes, 132
de Stoll-Hausheer, 130

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

amostra, 130
método, 131
observações, 131
reagentes, 130
de Teesdale-Amin, 137
Óxido de mercúrio, 363

P

PAF (fenol-álcool-formaldeído, fixador)
Page
meio de, 419
solução de, 419
Panmede, 423, 454
Panstrongylus megistus, 669
Pantotenato de cálcio, 400, 476
Papanicolaou, coloração de, 658
Papel Whatman, 328
Papel-filtro
em placa de Petri, cultura de larvas nematóides no, 121
amostra, 121
método, 121
observações, 122
em tubo de ensaio, cultura de larvas nematóides em, 119
amostra, 119
método, 119
observações, 119
Pappenhein, coloração de, 200
Parafina, 567
console para confecção de blocos de, 567
vaselina e, *swab* de, 170
método do, na pesquisa de *Enterobius vermicularis*, 169
amostra e colheita, 169
controle de qualidade, 169
observações, 170
preparação e método, 169
reagentes, 169
PAF (ver, fixador fenol-álcool-formaldeído)
Paraformaldeído, 737
Paragonimus
westermani,
mexicanus,
PCR (ver, reação em cadeia da polimerase)
Perianal região, colheita de ovos,
Pentatrichomonas hominis,
Phocanema spp.,
Plasmodium,
falciparun,
malariae,
ovale,
vivax,
Pleistophora spp.,
Parasitemia, 149
Parasitofiltro, 116
Parasitologia clínica, controle de qualidade em, 577-609
coleções de parasitos de referência, 603
helmintos
do sangue e dos tecidos, 604
intestinais, 604
protozoários
do sangue e dos tecidos, 603
intestinais, 603
urogenitais, 603
cultivo de protozoários, 601
Entamoeba histolytica, 601
Leishmania spp., 602
Trichomonas vaginalis, 601
Trypanosoma cruzi, 602
equipamento, 583
exame de outros espécimes do trato intestinal e sistema urogenital, 598
material de sigmoidoscopia, 598
exame direto a fresco, 598
esfregaços permanentes corados, 598
pesquisa de *Trichomonas vaginalis*, 599
exame direto a fresco, 599
coloração de Giemsa, 599
escarro, 600
externo, 580
garantia de qualidade, 578
atividades
analíticas, 579
pós-analíticas, 579
pré-analíticas, 578
interno, 579
manual de procedimentos, 580
material de referência, 580
morfometria feita com micrômetro ocular, 584
parasitos
da *American Type Culture Collection* para controle de qualidade, 604
do sangue e dos tecidos, 595
do sangue e dos tecidos, coloração de esfregaços sangüíneos, 597
método da membrana filtrante, 598
técnica de Knott, 597
do sangue e dos tecidos, esfregaços estirado e espesso, 595
coloração de Giemsa, 595
coloração pela hematoxilina de Delafield, 596
protozoários e helmintos intestinais, 584
colheita da amostra fecal, 584
colorações específicas
para coccídios, 590
para microsporídios, 591
para microsporídios, métodos de Weber-Ryan, 591
colorações permanentes, 588
derivadas de hematoxilina, 589
pelo tricrômico, 590
colorações temporárias, 588
soluções de iodo, 588
exame direto a fresco, 585
isolamento e cultura de larvas de nematóides, 593
método da cápsula duodenal, 594
pesquisa de *Enterobius vermicularis*, 594
preservadores, 586
fixador álcool polivinílico, 587
fixador de Schaudinn, 587

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

reagentes, corantes e outras soluções, 585
técnicas de concentração, 592
centrífugo-flutuação em solução de sacarose, 592
de flutuação, 592
de sedimentação, 593
qualificação do pessoal técnico, 583
Parasitos
colorações para a identificação de, de diferentes tecidos, 218
da *American Type Culture Collection* para controle de qualidade, 604
da malária, 690
do trato geniturinário, 159
não-patogênicos, 155
patogênicos, 155
que podem ser transmitidos em laboratório, 632
Parasitos do sangue, 159
Parasitos do sangue e dos tecidos, 595
coloração de esfregaços sangüíneos, 597
método da membrana filtrante, 598
técnica de Knott, 597
esfregaços estirado e espesso, 595
coloração
de Giemsa, 595
pela hematoxilina de Delafield, 596
Parasitos, diagnóstico e identificação de, 663-724
amebas intestinais, 672
Blastocystis hominis, 679
Endolimax, 674
Endolimax nana, 678
cistos, 678
trofozoítos, 678
Entamoeba, 672
Entamoeba coli, 676
cistos, 677
trofozoítos, 676
Entamoeba hartmanni, 677
cistos, 677
trofozoítos, 677
Entamoeba histolytica, 674
cistos, 675
trofozoítos, 674
Iodamoeba, 674
Iodamoeba bütschlii, 678
cistos, 678
trofozoítos, 678
cestóides dos tecidos, 671, 714
Echinococcus granulosus, 714
areia hidática, 714
ovos, 714
vermes adultos, 714
cestóides intestinais, 670, 711
Hymenolepis diminuta, 713
ovos, 713
vermes adultos, 713
Hymenolepis nana, 712
ovos, 713
vermes adultos, 712
Taenia solium e *Taenia saginata*, 711
cisticerco, 712
ovos, 712
vermes adultos, 711
ciliados intestinais, 683
Balantidium coli, 683
cistos, 684
trofozoítos, 683
coccídios intestinais, 684
Cryptosporidium parvum, 684
oocistos, 684
Cyclospora cayetanensis, 684
oocistos, 684
Isospora belli, 685
oocistos, 685
critérios para a diferenciação das espécies do gênero *Plasmodium*, 690
Plasmodium
falciparum, 690
malariae, 691
ovale, 695
vivax, 691
diagnóstico dos helmintos, 696
diagnóstico dos protozoários do sangue e dos tecidos, 688
Leishmania spp., 689
amastigota, 689
promastigota, 689
Toxoplasma gondii, 688
trofozoítos, 688
Trypanosoma cruzi, 688
amastigota, 689
tripomastigota, 688
flagelados intestinais, 679
Chilomastix mesnili, 679
cistos, 680
trofozoítos, 679
Dientamoeba fragilis, 682
trofozoítos, 682
Enteromonas hominis, 682
cistos, 682
trofozoítos, 682
Giardia lamblia, 680
cistos, 681
trofozoítos, 680
Retortamonas intestinalis, 682
cistos, 682
trofozoítos, 682
humanos
de importância clínica, 717
cestóides, 720
nematóides, 719
protozoários, 717
trematódeos, 720
e suas localizações primárias, 720
nematóides, 669
nematóides do sangue e dos tecidos, 670, 708
Angiostrongylus costaricensis, 710
vermes adultos, 710
Mansonella ozzardi, 708
microfilárias, 710
vermes adultos, 708
Onchocerca volvulus, 710
microfilárias, 710
vermes adultos, 710

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Wuchereria bancrofti, 708
microfilárias, 708
vermes adultos, 708
nematóides intestinais, 669, 702
Ancilostomídeos, ovos de, 706
Ancylostoma duodenale, 704
ovos, 705
vermes adultos, 704
Ascaris lumbricoides, 702
ovos, 702
vermes adultos, 702
Capillaria philippinensis, 703
ovos, 703
vermes adultos, 703
Enterobius vermicularis, 703
ovos, 704
vermes adultos, 703
Necator americanus, 705
ovos, 706
vermes adultos, 705
Strongyloides stercoralis, 707
larvas filarióides, 707
larvas rabtidóides, 707
Trichuris trichiura, 702
ovos, 703
vermes adultos, 702
protozoários
com diferentes localizações, 667
amebas, 667
coccídios, 668
flagelados, 668
microsporídios, 668
do sangue e dos tecidos, 668
esporozoários, 668
flagelados, 669
intestinais, 663
amebas, 664
ciliados, 666
coccídios, 666
diagnóstico, 671
flagelados, 665
microsporídios, 667
trematódeos, 671
trematódeos do sangue, fígado e pulmões, 714
Fasciola hepatica, 715
ovos, 717
vermes adulto, 715
Schistosoma mansoni, 714
ovos, 715
vermes adultos, 714
Trichomonas
hominis, 687
tenax, 687
vaginalis, 686
Parasitoses, 505-540
antígenos, 509
biologia molecular aplicada às infecções parasitárias, 508
métodos indiretos, 508
considerações gerais, 505
diagnóstico das, 507
métodos diretos, 507
fenômenos imunológicos, 506
formação de imunocomplexos, 506
mecanismos auto-imunes, 506
reação do tipo anafilática, 506
humanas, métodos moleculares no diagnóstico das, 543-556
reação em cadeia da polimerase, 544
deoxinucleotídeos trifosfatados, 547
dosagem de DNA, 545
extração de DNA, 545
iniciadores, 546
reação, 548
tampão, 547
taq DNA polimerase, 547
termocicladores, 548
visualização dos resultados, 549
aplicações práticas, 550
cuidados com as contaminações, 552
genes de interesse, 552
imunoglobulinas/anticorpos, 510
IgA, 511
IgD, 511
IgE, 511
IgG, 510
IgM, 510
imunologia das, 505
marcadores imunológicos no diagnóstico de algumas infecções parasitárias, 521
helmintos, 528
cisticercose, 528
esquistossomose mansônica, 530
hidatidose, 531
toxocaríase, 533
protozoários, 521
amebíase, 521
doença de Chagas, 522
leishmaniose, 523
toxoplasmose, 525
métodos utilizando ligantes, 514
imunoenzimáticos, 516
imunofluorescência, 514
direta, 515
indireta, 515
quimioluminescência e outros, 516
radioimunoensaio, 516
Western ou *Imunoblot*, 516
modelos de estudo, 507
parâmetros dos testes imunológicos, 517
reação cruzada e reação inespecífica, 509
teste
de hipersensibilidade
imediata, 520
tardia, 520
de imunidade celular, 521
imunológicos, 511
imunológicos, nas infecções parasitárias, 518
ciclo biológico, 519
cinética da produção de anticorpos e perfil imunológico da infecção, 520
escolha do material biológico e conservação da amostra a ser examinada, 519
hospedeiro humano, 519
intensidade e localização do

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

parasitismo, 519
mecanismos de evasão parasitária, 519
papel da resposta imune, 520
parâmetros do método imunodiagnóstico, 520
relação parasito/hospedeiro, 519
imunológicos, parâmetros dos
eficiência, 518
especificidade, 518
limiar de reatividade, 517
sensibilidade, 518
imunológicos, princípios de alguns, 511
aglutinação, 513
precipitação, 511
reação de fixação do complemento, 513
imunológicos, simplicidade e custo dos, 518
Pasteur, pipeta de, 183, 407, 420
Paul-Bunnel-Davidson, reação de, 496
PCR (v. Reação em cadeia da polimerase)
Pele
exame da, 215
fragmentos cutâneos da, 216
material de abscessos da, 418
método do fragmento superficial da, 216
Penicilina G potássica, 402, 422, 456
Pentatrichomonas, 469
hominis, 687
Peptídeo(s)
8kDa, 532
16kDa, 532
21kDa, 532
38kDa, 532
antigênicos, 531
Perfil TORCH, 525
Peróxido de hidrogênio, 208, 209
Petri, placa de, 358, 734
cultura de larvas nematóides no papel-filtro em, 121
amostra, 121
método, 121
observações, 122
Phillipson, técnica de, 53
Phocanema, 178
Picroformaldeído, 736
Pinça de Mohr, 116
Pipeta(s)
capilar, 59
de Pasteur, 183, 407, 420
de Stoll, 130
Piridoxina, 400
Placa
de ágar, cultura em, 419
exame, 421
meio de Page, 419
monoxênica, 420
não-nutritivo, 419
observações, 422
preparação, 419
reagentes, 419
Strongyloides stercoralis, 124
amostra, 125
meio de cultura, 125
método, 125
observações, 126
reagentes, 125
de petri, 358, 734
cultura de larvas nematóides no papel-filtro em, 121
amostra, 121
método, 121
observações, 122
Placenta, exame da, 527
Plasmodium
malariae, 291, 333, 447, 691
ovale, 333, 447, 695
vivax, 291, 333, 447, 691
Plasmodium falciparum, 291, 333, 447-452, 690
criopreservação de cepas, 450
controle de qualidade, 451
técnica descrita por Christofinis-Miller, 450
solução crioprotetora de DMSO a 20%, 450
técnica descrita por Meryman-Hornblower, 451
meio de cultura de Trager-Jensen, 448
implantação da cultura, 449
manutenção das culturas, 450
preparação das hemácias normais para renovação da cultura, 449
reagentes, 448
RPMI completo, 449
Plasmodium spp., 333-344
diagnóstico de laboratório, 339
esfregaço espesso ou esfregaço estirado, 339
ICT Malaria PF/PV e OpitMAL, 342
ParaSight-F e ICT Malaria PF, 340
Quantitative Buffy Coat, 340
epidemiologia, 335
imunidade, 335
morfologia, 336
patogenia, 333
destruição dos eritrócitos parasitados, 334
lesão capilar por deposição de imunocomplexos, 334
seqüestro dos eritrócitos parasitados na rede capilar, 334
toxicidade resultante da liberação de citocinas, 334
quadro clínico, 334
Pleocitose, 529
Plestophora sp., 218
Pneumocistose, 657
Pneumocystis carinii, 218, 655-662
abordagem diagnóstica, 655
colheita do espécime clínico, 656
diagnóstico etiológico, 656
coloração pela Prata de Grocott, 657
anticorpos monoclonais, 657
calcofluor, 657
histopatologia e citologia, 656
método de Giemsa, 657
reação em cadeia da polimerase, 657

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

método rápido de coloração pela prata, 658
amostras, 658
coloração da amostra, 660
controle de qualidade, 661
preparação das soluções, 659
reagentes, 658
Pneumonia, 207
por *Pneumocystis carinii*, 657
Pneumonite, 207
Pohlenz, método de, 74
Pólen, grãos de, 143
Poli-L-lisina, solução de, 570
Polimerase, reação em cadeia da, 657
Polychrome IV, preparação e coloração pelo corante, 112
Potássio
bicromato de, 738, 746
cloreto de, 439, 741
diidrogenofosfato de, 189, 419, 432
hidrogenocarbonato de, 455
hidróxido de, 76
iodeto de, 19, 277, 383
metabissulfito de, 658
Prata de Grocott, coloração pela, 657
Prata-metenamina, 256
Pratylenchus, 142
Preparações
permanentes para ovos e larvas de helmintos, 733-735
cestóides, 734
nematóides, 734
trematódeos, 735
salinas, 34
Processador automático de tecidos, 566
Proglotes grávidas, 31
Proliferação de fungos, 252
Prolina, 444
Propídio, iodeto de, 256
Proteína, eletroforese de, 524
Proteose peptone-extrato de levedo-glicose, meio de, 422
inoculação e axenização da cultura, 423
para *Acanthamoeba*, 422
preparação, 423
Protozoários, 143, 521
amebas, 143
amebíase, 521
ciliados, 147
colorações temporárias para 733
com diferentes localizações, 667
amebas, 667
coccídios, 668
flagelados, 668
microsporídios, 668
cultivo de, 601
Entamoeba histolytica, 601
Leishmania spp., 602
Trichomonas vaginalis, 601
Trypanosoma cruzi, 602
do sangue e dos tecidos, 603, 668
esporozoários, 668
flagelados, 669
do sangue e dos tecidos, diagnóstico dos, 688
Leishmania spp., 689
amastigota, 689
promastigota, 689
Toxoplasma gondii, 688
trofozoítos, 688
Trypanosoma cruzi, 688
amastigota, 689
tripomastigota, 688
doença de Chagas, 522
e helmintos intestinais, 584
colheita da amostra fecal, 584
colorações específicas para coccídios, 590
colorações específicas para microsporídios, 591
métodos de Weber-Ryan, 591
colorações permanentes, 588
derivadas de hematoxilina, 589
pelo tricrômico, 590
colorações temporárias, 588
soluções de iodo, 588
exame direto a fresco, 585
isolamento e cultura de larvas de nematóides, 593
método da cápsula duodenal, 594
pesquisa de *Enterobius vermicularis*, 594
preservadores, 586
fixador álcool polivinílico, 587
fixador de Schaudinn, 587
reagentes, corantes e outras soluções, 585
técnicas de concentração, 592
centrífugo-flutuação em solução de sacarose, 592
de flutuação, 592
de sedimentação, 593
exame cultural de, 160
flagelados, 147
intestinais, 37, 663
amebas, 664
ciliados, 666
coccídios, 666
diagnóstico, 671
e urogenitais, 603
flagelados, 665
microsporídios, 667
leishmaniose, 523
toxoplasmose, 525
Pseudo-hifas, 158
Pseudo-simbiontes, 141
Pulmão, aspirados, 212
Punção venosa, 358

Q

Quantitative Buffy Coat, 340, 347
Quensel
coloração de, 38
corante de, 42
solução de, 41
Quilocele, 375

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Quilúria, 375, 389
Quimioluminescência
  ensaio de, 501
  método de, 516
Quimioterapia antiblástica, 506

R

Radioallergosorbent test, 501
Radioimunoensaio, 501
  método de, 516
  radioallergosorbent test, 501
Raios UV, 515
Raspado conjuntival, 482
Reação(ões)
  anafilática, 506
  da imunofluorescência
   indireta, 347
  de aglutinação, 496
    coaglutinação, 498
    direta, 496
    hemaglutinação, 497
      de inibição da, 497
    passiva ou indireta, 496
    teste de aglutinação
      de cristais de colesterol, 497
  de fixação do
   complemento, 178, 318, 498, 513
  de imunofluorescência indireta, 318, 329
  de Paul-Bunnel-Davidson, 496
  de precipitação, 493
    imunodifusão radial
      dupla, 494
      simples, 494
    imunoeletroforese, 494
    imunofixação, 495
    nefelometria, 495
    turbidimetria, 495
  em cadeia da polimerase, 320, 329, 348,
   387, 544, 657
  inflamatória eosinofílica na parede do
   intestino, 352
Região anal, 165
Relação parasito/hospedeiro, 519
Resina sintética, 230
Respiradores, 616
Restos celulares, 485
Retalho cutâneo, 216, 357
Retina, lesões na, 515
Retinocoroidite, 526
Reto, exame do, 217
Retortamonas intestinalis, 665, 682
  cistos, 682
  trofozoítos, 682
Rhodnius prolixus, 522, 669
Riboflavina, 400
Rim, células de
  de cão, 481
  de coelho, 481
  de macaco, 481
Ringer, solução de, 35
Ritchie, técnica de, 58
Rivas, técnica de, 58
RK-13, 481
RNA, 195, 508
Robinson, meio de, 411
  cultivo xênico, 411
Rohwedder, método de, 310
Romanowsky, derivados de, 196
RPMI, 481
Rugai-Mattos-Brisola, método de, 117
  amostra, 117
  método, 118
  observações, 118
Ruptura da casca quitinosa calcária, 528

S

Sacarose, 73
  solução de, 72, 74
Saco de musselina, 409
SAF (v.t. fixador acetato de sódio-ácido
 acético-formaldeído),
Safranina
  O, 244
  método de coloração da, 237, 590
    amostra, 238
    características de coloração, 239
    coloração da amostra, 238
    controle de qualidade, 239
    de oocistos de *Cryptosporidium*
     parvum, 248
      amostra, 248
      coloração da amostra, 249
      observações, 247
      reagentes, 248
      soluções, 248
    de oocistos de *Cyclospora*
     cayetanensis, 245
      amostra, 246
      características da coloração, 247
      coloração da amostra, 246
      reagentes, 246
      soluções, 246
    preparação das soluções, 238
    rápido, 244
      amostra, 244
      características da coloração, 245
      coloração da amostra, 245
      observações, 245
      preparação das soluções, 244
      reagentes, 244
    reagentes, 238
Sais, solução de, 439
Salicilato de sódio, 249
Sangue
  bancos de, 523
  desfibrinado de coelho, 441
  digesto péptico de, 455
  exame do, 291-311
  exame do, a fresco, 357
    esfregaços sangüíneos espessos e
     corados, 357
      preparação, 358

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

método da contagem em câmara, 359
procedimento, 359
exame do, coloração dos esfregaços sangüíneos, 296
de Field, 300
coloração, 301
preparação dos corantes, 301
reagentes, 300
de Giemsa, 296
coloração, 298
controle de qualidade, 299
preparação do corante, 296
reagentes, 296
de Leishman, 301
coloração, 302
preparação do corante, 302
reagentes, 302
de Wright, 302
coloração, 303
controle de qualidade, 304
preparação do corante, 303
reagentes, 302
exame do, concentração, 305
centrifugação, 306
amostra, 306
controle de qualidade, 307
método, 306
reagentes, 306
centrifugação do micro-hematócrito, 309
método do QBC, 310
procedimento de Feilij, 309
procedimento de La Fuente, 310
centrifugação tríplice, método de, 307
amostra, 307
controle de qualidade, 308
método, 307
reagentes, 307
método da membrana filtrante, 310
técnica da diferença de gravidade, 310
método de Budzko e Kierszanbaum, 310
método de Rohwedder, 310
técnica das fito-hemaglutininas, 308
amostra, 308
controle de qualidade, 309
método, 309
reagentes, 308
exame do, preparação dos esfregaços sangüíneos, 292
esfregaços espessos, 293
controle de qualidade, 294
preparação, 293
esfregaços estirados, 292
preparação, 293
parasitos do, 159
Sapero-Lawless, solução de, 38
Sappnia diploidea, 146
Sarcocystis suihominis, 224
Sarcodina, 521
Sargeaunt, corante de, 732
Schaudinn
fixadores de, 11, 208, 581, 587
desvantagens, 13
modificado, 13
vantagens, 13
líquido de, 172
Schiff, ácido periódico de, 229, 256, 267
Schistosoma
haematobium, 217
japonicum, 217
mansoni, 714
métodos coprológicos quantitativos específicos para o diagnóstico do, 132
ovos, 715
vermes adultos, 714
Schneider, meio de cultura de, 443
Schneider's Insect Medium, meio de, 443
Schüffner, granulações de, 296
Secreção
dos ouvidos, 420
prostática, 185
uretral, colheita de, com um alça de platina, 185
urogenital, exame da, 178
vaginal, 185
esfregaços de, 377
Sedimentação, técnicas de, 57
centrífugo-sedimentação
pela formalina-acetato de etila, 61
pela formalina-éter, 61
pelo acetato de sódio-ácido acético, 69
corante iodo-tricrômico para sedimento, 70
espontânea, 58
Sedimento centrifugado da urina matinal, 193
Seitz, 726
Septata intestinalis, 266, 480
Seringa hipodérmica, 32
Sheather, solução de, 74
SIDA (v. AIDS)
Sífilis, 498
Sigmoidoscopia, 174
material de
esfregaços permanentes corados, 176
amostra e colheita, 176
controle de qualidade, 177
método, 177
observações, 178
reagentes, 177
exame direto a fresco, 174
amostra e colheita, 175
controle de qualidade, 175
método, 175
observações, 176
reagentes, 175
Simplified-Trypticase-Serum, meio de cultura, 458
preparação, 458
Síndrome
da imunodeficiência adquirida (v. AIDS)
de larva *migrans* visceral (SLMV), 533
de Loeffler, 207
nefrótica, 334
tipo-mononucleose, 525
Sinonasal, biópsia de, 482
Sistema(s)
avidina-biotina, 500

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

de emergência hospitalar, 618
hemolítico, 514
nervoso central, 417
Sistema urogenital, exame de espécimes do, 178
das culturas, 198
imunodiagnóstico, 199
microscópico, 190
coloração de Giemsa, 196
características da coloração, 197
coloração da amostra, 196
controle de qualidade, 197
observação, 196
reagentes e preparação, 196
coloração pela solução de iodo de D'Antoni, 195
coloração da amostra, 195
preparações fixadas e coradas, 195
reagentes, 195
corante *Vaginal Identification of Pathogens*, 193
amostra, 193
características da coloração, 194
coloração da amostra, 194
preparações das soluções, 194
reagentes, 194
direto a fresco, 191
controle de qualidade, 192
método, 191
observações, 192
preparações coradas, 193
pesquisa de *Trichomonas vaginalis*, 184
amostra, 185
colheita da amostra, 185
preservação da amostra, 187
permanente, 190
preparação e colheita, 189
reagentes, 187
temporária, 187
técnica da concentração da urina
pela centrifugação, 179
colheita da amostra, 180
controle de qualidade, 181
método, 181
observações, 181
reagentes, 180
pela membrana filtrante, 181
controle de qualidade, 184
hematoxilina de Harris, segundo Mallory, 182
método, 183
observações, 184
reagentes e materiais, 182
tríplice, 179
método, 179
reagentes e material, 179
Sódio
acetato de, 273, 742
triidratado, 249
borato de, 658
carbonato de, 742
citrato de, 308, 422, 439
cloreto de, 439, 741
solução saturada de, 50
diidrogenofosfato de, 9
hidrogenocarbonato de, 278, 455
hidrogenossulfito de, 658
hidróxido de, 600, 742
solução de, 208
L-glutamato de, 444
salicilato de, 249
tioglicolato de, 189, 451, 454
tiossulfato de, 658
Sódio-ácido acético, acetato de, 69
Sódio-ácido acético-formaldeído, solução fixadora acetato de, 251
Solução(ões)
ácido-citrato-dextrose, 726
álcool-ácido, 233
aquosa
de ácido sulfúrico, 231
de azul-de-metileno, 236
saturada, 42
de fenol, 48
de safranina, 238
de verde de malaquita, 48, 231
glicerinada, 135
saturada
de carbonato de lítio, 92
de cloreto de mercúrio-II, 11
citrato-fosfato-dextrose, 726
de ácido
clorídrico, 248
fosfotúngstico, 95
de ácido-álcool, 251
de álcool
de ácido clorídrico, 248
etílico-amônia, 251
formaldeído-ácido acético, 734
saturada de Sudan III, 42
de Alsever, 727
de antibióticos, 439
de azul-de-metileno de Nair, 585
de Bayer, 739
de Bucki, 38
de carbonato de lítio, 92
de citrato de sódio, 729
de cloreto
de cádmio, 42
de mercúrio-II, 11
de Dobell, 38
de eosina, 571
de fenol, 48
de Kohn, 108
amostra, 109
coloração da amostra, 109
observações, 109
reagentes, 109
de formaldeído, 9, 562
não tamponada, 11
desvantagens, 11
vantagens, 11
salina, 10
tamponada, 10
desvantagens, 11
vantagens, 11
de glicose, 439
de Hanks, 486

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

de hemina, 438, 439
de heparina, 729
de hidrogenoftalato, 414
de hidróxido de sódio, 208
de infuso de fígado, 438
de iodo, 38, 40, 588
  de Dobell-O'Connor, 39
  de Lugol, 19, 38, 208
  de mertiolato-iodo-formaldeído, 46
  de Quensel, 41
  tamponada de azul-de-metileno de Nair, 43
de iodo de D'Antoni, 208
  coloração pela, 195
    da amostra, 195
    preparações fixadas e coradas, 195
    reagentes, 195
  modificada, 39
de Kohn, 38, 108
de Locke, 188, 651
de Lugol, 680
de Page, 419
de poli-L-lisina, 570
de Ringer, 35
de sacarose, 72, 74
de safranina, 238
de Sapero-Lawless, 38
de saponina, 295
de Sheather, 74
de sulfato
  de cobre, 13, 617
  de magnésio, 53
  de zinco, 52, 53
de Tween, 403
de verde de malaquita, 48, 231
de Wells-Vail, 38
estoque de Triton X-100, 298
fixadora
  acetato de sódio-ácido acético-formaldeído, 251
  MIF, 66
para lentes de contato, 421
salina(s), 10, 439
  balanceadas, 741
  de formaldeído, 562
  para ameba, 419
  tamponada de Tris, 483
saturada
  de cloreto de sódio, 50
  de Ninhidrina, 133
tampão
  alcalina, 297
  de fosfato, 209, 297
    de Sörensen, 189
tamponada(s), 742
  de formaldeído, 562
  de fosfatos, 743
  massa molecular, 742
  molar, 742
  para limpeza de vidraria, 745
  PBS, 745
triton tamponada, 209
Vaginal Identification of Pathogens, 192
VIP (v. *Vaginal Identification of Pathogens*)
Sondas de DNA, 508
Sörensen, solução tampão de fosfato de, 189
Soro(s)
  bovino, 455
  de búfalo, 458
  de cavalo, 455
  fetal
    bovino, 440, 481
      estéril inativado, 440, 442
    de bezerro, 463
  hiperimunes, 511
  imune, 511
  ovino inativado, 455
Sphaerita spp., 147
Stoll
  método de, modificado, 132
    reagentes, 132
  pipetas de, 130
Stoll-Hausheer, método de, 130
  amostra, 130
  observações, 131
  reagentes, 130
Strongyloides stercoralis, 388, 707
  cultura de, em placa de ágar, 124
    amostra, 125
    meio de cultura, 125
    método, 125
    observações, 126
    reagentes, 125
  larvas de, 156, 388
    filarióides, 707
    rabtidóides, 707
STS, meio de cultura, 198
Substrate-Labelled Fluorescent Immunoassay, 499
Sudan III, solução alcoólica saturada de, 42
Sulfato
  de alumínio amoniacal, 365
  de amônio, 413
  de bário, contraste, 126
  de cobre, solução de, 13, 617
  de estreptomicina, 422, 430, 456
  de magnésio, 422, 741
    solução de, 53
  de sódio-ácido clorídrico-triton-éter, 58
  de zinco, 55
    solução de, 52
  férrico amoniacal, 250
  ferroso amoniacal, 250, 422
Sulforodamine B, corante, 342
Sumário de urina, 389
Supuração dos ouvidos, 418
Swab
  anais 165, 594
  de vaselina e parafina, 170
    método do, na pesquisa de *Enterobius vermicularis*, 169
      amostra e colheita, 169
      controle de qualidade, 169
      observações, 170
      preparação e método, 169
      reagentes, 169

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

T

Taenia
crassiceps, 529
saginata, 31
solium, 31, 528
spp., 168
identificação de proglotes de, 29
método da tinta da China, 32
método de Campos, 31
método do ácido acético glacial, 31
Tampão de fosfatos, 444
Taq DNA polimerase, 547
Taquímetro fotoelétrico, 616
TAU (v. *Triatomine Artificial Urine*)
Tecido(s)
exame dos, 215-218
método do fragmento superficial da pele, 216
método, 216
reagentes, 216
muscular e subcutâneo, 216
pele, 215
raspados e material de biópsia da córnea, 217
método, 218
reagentes, 217
reto e bexiga, 217
processador automático de, 566
Técnica(s) (v.t. Método)
da cápsula duodenal, 594
da concentração da urina
pela centrifugação, 179
colheita da amostra, 180
controle de qualidade, 181
método, 181
observações, 181
reagentes, 180
pela membrana filtrante, 181
controle de qualidade, 184
hematoxilina de Harris, segundo Mallory, 182
método, 183
observações, 184
reagentes e materiais, 182
tríplice, 179
método, 179
reagentes e material, 179
das fito-hemaglutininas, 308
amostra, 308
controle de qualidade, 309
método, 309
reagentes, 308
de aglutinação, 513
de Bailenger, 58
de Berlin, 76
de Blagg, 58
de coloração, 570
corantes, 571
hematoxilina de Harris, 571
solução de eosina a 1%, 571
de concentração, 49, 492
centrífugo-flutuação em solução de sacarose, 592
de flutuação, 50, 592
centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco, 53
em solução de sulfato de magnésio, 53
em solução de sulfato de zinco, 52
em solução saturada de cloreto de sódio, 50
de sedimentação, 593
específica para coccídios, 72
centrífugo-flutuação em solução de Sacarose, 72
centrífugo-sedimentação pelo formaldeído-éter modificado, 74
centrífugo-sedimentação pelo hidróxido de potássio, 76
de congelação, 563
de Faust, 53
de flutuação, 50, 592
de Hoffman-Pons-Janer, 58
de Hunter, 58
de Jahnes-Hodges, 58
de Knott, 306, 368, 597
amostra, 368
controle de qualidade, 368
reagentes, 368
de Loughlin-Spitz, 58
de Loughlin-Stoll, 58
de Lutz, 58
de Oshima, 58
de Ouchterlony, 494
de Phillipson, 53
de Ritchie, 58
de Rivas, 58
de rotina em histologia, 559-576
coloração, 570
coloração, corantes, 571
hematoxilina de Harris, 571
solução de eosina a 1%, 571
congelação, 563
considerações gerais, 559
cortes, 567
fixação, 560
fixadores, 561
fixadores, soluções, 562
de formaldeído a 10%, 562
fixador de Bouin, 562
salina de formaldeído a 10%, 562
tamponada de formaldeído a 10%, 562
inclusão em meio sódio, 564
montagem, 572
processamento de tecidos, 562
protocolo
básico para coloração com hematoxilina e eosina, 572
básico para inclusão em parafina, 567
geral de preparo de lâminas histológicas, 560
para montagem de lâminas permanentes, 573
recomendações gerais, 573
de sedimentação, 57

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

centrífugo-sedimentação
pela formalina-acetato de etila, 61
pela formalina-éter, 61
pelo acetato de sódio-ácido acético, 69
corante iodo-tricrômico para sedimento, 70
espontânea, 58
de Teleman, 58
de Tomb-Helmy, 58
de Weller-Dammin, 58
de Willis, 50
para identificação da espécie de microfilária, 380
Willis, 53
Teesdale-Amin, método de, 137
Teleman, técnica de, 58
Terapêutica imunossupressora, 506
Termocicladores, 548
Termômetro, 618, 619
controle de qualidade, 621
manutenção preventiva, 620
Teste(s)
de aglutinação
de cristais de colesterol, 497
para toxoplasmose, 496
de esterilidade, 401, 444, 462
em tioglicolato de sódio, 726
de hemaglutinação, 318
de hipersensibilidade imediata, 520
de imunidade celular, 521
de VDRL, 497
de Widal para salmonelose, 496
dot-ELISA, 329, 523
ELISA, 516, 523
enzimáticos, 514
falso-negativos, 520
falso-positivos, 520
fluorescentes heterogêneos, 499
imunofluorescência
direta, 499
indireta, 500
fluorescentes, 514
homogêneos de modulação
direta, 499
indireta, 499
imunoenzimático, 517
imunológicos, 511
IgE específicos, 511
nas infecções parasitárias, 518
ciclo biológico, 519
cinética da produção de anticorpos e perfil imunológico da infecção, 520
escolha do material biológico e conservação da amostra a ser examinada, 519
hospedeiro humano, 519
intensidade e localização do parasitismo, 519
mecanismos de evasão parasitária, 519
papel da resposta imune, 520
parâmetros do método imunodiagnóstico, 520
relação parasito/hospedeiro, 519
parâmetros dos, 517
eficiência, 518
especificidade, 518
limiar de reatividade, 517
sensibilidade, 518
princípios de alguns, 511
aglutinação, 513
precipitação, 511
reação de fixação do complemento, 513
simplicidade e custo dos, 518
intradérmico de Casoni, 532
luminescentes, 514
provocativo com DEC, 384
radioativos, 514
sorológicos ou imunoensaios, 493-504
sorológicos ou imunoensaios, ensaio com marcadores enzimáticos, 501
enzimaimunoensaio, 501
com captura de IgM, 502
com micropartículas, 503
Enzyme Multiplied Immunoassay Technique, 502
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, 502
ensaio de quimioluminescência, 501
sorológicos ou imunoensaios, ensaios com marcadores fluorescentes, 498
heterogêneos, 499
imunofluorescência direta, 499
imunofluorescência indireta, 500
homogêneos de modulação
direta, 499
dupla, 499
indireta, 499
sistema avidina-biotina, 500
sorológicos ou imunoensaios, ensaios com marcadores radioativos, 501
radioimunoensaio, 501
radioallergosorbent test, 501
sorológicos ou imunoensaios, ensaios de imuno-histoquímica, 500
imunoperoxidase, 500
imunocitoquímica, 500
sorológicos ou imunoensaios, ensaios líticos, 498
de neutralização, 498
reação de fixação do complemento, 498
sorológicos ou imunoensaios, reações de aglutinação, 496
coaglutinação, 498
de cristais de colesterol, 497
direta, 496
hemaglutinação, 497
de inibição da, 497
passiva ou indireta, 496
sorológicos ou imunoensaios, reações de precipitação, 493
imunodifusão radial
dupla, 494

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

simples, 494
imunoeletroforese, 494
imunofixação, 495
nefelometria, 495
turbidimetria, 495
sorológicos ou imunoensaios, técnicas de
imunoeletrotransferência, 503
Western Blotting, 503
Thoma, câmara de, 469
Thonson, corante de, 732
Tiamina, cloreto de, 400, 476
Timerasol, 46
Timol, 249
Tinta da China
injeção de, 32
método da, 32
Tintura de mertiolato, 19, 46, 249
Tioglicolato de sódio, 189, 451, 454, 726
Tionina, preparação e coloração pela, 107
amostra, 107
características da coloração, 108
coloração da amostra, 108
preparação da solução, 108
reagentes, 108
Tiossulfato de sódio, 658
Tolueno, 250
Toluol, 250, 365
Tomb-Helmy, técnica de, 58
TORCH, perfil, 525
Toxicidade resultante da liberação de citocinas, 334
Toxocaríase, 506, 533
Toxoplasma gondii, 218, 525, 688
trofozoítos, 688
Toxoplasmose, 525
Trachipleistophora hominis, 480
Transmissão placentária, 525
Trato geniturinário, parasitos do, 159
Trato intestinal e sistema urogenital, exame de espécimes do, 178
das culturas, 198
imunodiagnóstico, 199
microscópico, 190
coloração de Giemsa, 196
características da coloração, 197
coloração da amostra, 196
controle de qualidade, 197
observação, 196
reagentes e preparação, 196
coloração pela solução de iodo de D'Antoni, 195
coloração da amostra, 195
preparações fixadas e coradas, 195
reagentes, 195
corante *Vaginal Identification of Pathogens*, 193
amostra, 193
características da coloração, 194
coloração da amostra, 194
preparações das soluções, 194
reagentes, 194
direto a fresco, 191
controle de qualidade, 192
método, 191
observações, 192
preparações coradas, 193
pesquisa de *Trichomonas vaginalis*, 184
amostra, 185
colheita da amostra, 185
preservação da amostra, 187
permanente, 190
preparação e colheita, 189
reagentes, 187
temporária, 187
técnica da concentração da urina
pela centrifugação, 179
colheita da amostra, 180
controle de qualidade, 181
método, 181
observações, 181
reagentes, 180
pela membrana filtrante, 181
controle de qualidade, 184
hematoxilina de Harris, segundo Mallory, 182
método, 183
observações, 184
reagentes e materiais, 182
tríplice, 179
método, 179
reagentes e material, 179
Trato intestinal, exame de espécimes do, 165-178
aspirado duodenal, 170
método da cápsula duodenal, 170
colheita da amostra, 171
controle de qualidade, 172
observações, 1723
procedimento, 172
reagentes, 171
considerações gerais, 165
endoscopia, 178
material de sigmoidoscopia
esfregaços permanentes corados, 176
amostra e colheita, 176
controle de qualidade, 177
método, 177
observações, 178
reagentes, 177
exame direto a fresco, 174
amostra e colheira, 175
controle de qualidade, 175
método, 175
observações, 176
reagentes, 175
pesquisa de *enterobius vermicularis*, 165
método da fita de celofane adesiva e transparente, 166
amostra e colheita, 166
controle de qualidade, 167
observações, 167
preparação e método, 166
reagentes, 166
método do *Swab* de vaselina e parafina, 169
amostra e colheita, 169

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

controle de qualidade, 169
observações, 170
preparação e método, 169
reagentes, 169
sigmoidoscopia, 174
Trato intestinal, mucosa do, 226
Travassos, fixador de, 736
Trematódeos, 671, 735
do sangue, fígado e pulmões, 714
Fasciola hepatica, 715
ovos, 717
vermes adulto, 715
Schistosoma mansoni, 714
ovos, 715
vermes adultos, 714
Triatoma infestans, 522, 669
Triatomine Artificial Urine, meio de cultura, 443, 444
Trichinella spiralis, 218
Trichomonas
hominis, 473, 477, 687
spp., 686
tenax, 473-477, 687
meio TTYS-CEEC$_{25}$, 474
básico, 475
completo, 477
extrato cru de embrião de galinha a 25%, 475
extrato de vitaminas NCTC 107 modificada, 476
reagentes, 474
técnica de isolamento, 477
vaginalis, 453-472, 686
considerações gerais, 453
tipos de movimentação de, em meio viscoso, 465
trofozoítos de, corados pelo método de Giemsa, 197
vaginalis, meios de cultura, 454
Connaught Medical Research Laboratory 1066, 463
observação, 463
preparação, 463
criopreservação, 467
congelação, 468
descongelação, 469
observações, 469
organismos, 468
reagentes e material, 468
solução criopreservadora, 468
Cysteine-Peptone-Liver-Maltose, 458, 460
preparação, 459, 461
de Feinberg e Whittington, 460
preparação, 460
*InPouch*TV™, 466
procedimentos de inoculação em, 464
amostras, 464
controle de qualidade, 464
método, 464
observação, 466
reagentes, 454
semi-sólido de Lowe para diagnóstico e transporte, 461
básico, 461
completo, 462
preparação, 462
Simplified-Trypticase-Serum, 458
preparação, 458
Trypticase-Yeast Extract-Maltose, 455
preparação, 456
Trypticase-Yeast Extract-Maltose modificado por Klass, 456
mistura de antibióticos, 456
preparação, 457
Trypticase-Yeast Extract-Maltose modificado por Kulda e Hollander, 457
preparação, 458
vaginalis, pesquisa de, 184
amostra, 185
colheita da amostra, 185
preservação da amostra, 187
permanente, 190
preparação e colheita, 189
reagentes, 187
temporária, 187
Trichostrongylus orientalis, 49, 50, 119
ovo de, 706
Trichuris
ovos de, 697
trichiura, 157, 582, 702
ovos de, 703
vermes adultos, 702
Tricomoníase, 184
urogenital, 190
Tricrômico
corante de, 208
de Wheatley, 38, 84
Tricrômico, preparação e coloração pelo, 100, 208
métodos
de Brooke, 102
amostra, 102
características da coloração, 104
coloração da amostra, 103
observações, 104
preparação das soluções, 102
reagentes, 102
de Wheatley, 100
amostra, 100
coloração da amostra, 101
preparação das soluções, 101
reagentes, 100
de Yang-Scholten, 105
amostra, 105
coloração da amostra, 106
controle de qualidade, 106
corante tricrômico, segundo Garcia e Bruckner, 105
preparação da amostra, 106
preparação das soluções, 105
reagentes, 105
Trietanolamina, 439
Tripanossomíases africanas, 213
Tripticase, 454
Triptona, 454
Tris, solução salina tamponada de, 483

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

Triton
NE, 61
X-100, 296
Triton-80, 68
Trichomonas
foetus, 469
suis, 469
Trofozoítos
ativos, 214
de *Trichomonas vaginalis* corados pelo método de Giemsa, 197
móveis, 172
Trypanosoma, 148
brucei
gambiense, 212
rhodesiense, 212
cruzi, 291, 313-324, 435-446, 522, 543, 688
amastigota, 689
cepas-padrão, 436
epimastigota, 689
forma epimastigota de cultura de, 440
reagentes, 436
tripomastigota, 688
cruzi, meios de cultura, 437
Brain Heart Infusion, 442
observação, 443
preparação, 442
reagentes, 442
completo, 440
de Schneider, 443
Liver infusion tryptose, 438
preparação, 438
reagentes, 438
MacNeal-Novy-Nicolle, 441
observações, 442
preparação, 441
reagentes, 441
Triatomine Artificial Urine, 443, 444
cruzi, métodos parasitológicos, 314
diretos, 314
a fresco, 314
de Strout modificado, 314
preparações coradas, 314
indiretos, 315
hemocultura, 316
inoculação em animais de laboratório, 317
xenocultura, 316
xenodiagnóstico, 315
moleculares, 320
reação em cadeia da polimerase, 320
sorológicos, 317
ensaio imunoenzimático, 319
reação de fixação do complemento, 318
reação de imunofluorescência indireta, 318
teste de hemaglutinação, 318
rangeli, 314, 435-446, 543
cepas-padrão, 436
rangeli, meios de cultura, 437
Brain Heart Infusion, 442
observação, 443
preparação, 442
reagentes, 442
completo, 440
de Schneider, 443
Liver infusion tryptose, 438
preparação, 438
reagentes, 438
MacNeal-Novy-Nicolle, 441
observações, 442
preparação, 441
reagentes, 441
Triatomine Artificial Urine, 443, 444
Trypticase-Yeast Extract-Maltose, meio de cultura
modificado
por Klass, 455, 456
mistura de antibióticos, 456
preparação, 456, 457
por Kulda e Hollander, 457
preparação, 458
Tryptose, 439, 454
Tryptose-trypticase-yeast, 474
Tubo de ensaio, cultura de larvas nematóides em papel-filtro em, 119
amostra, 119
método, 119
observações, 119
Turbidimetria, 495
Tween, solução de, 403
Tween-80-solução tampão de citrato, 58
TYM, meio de cultura, 198
modificado por Hollander, 198
Tyndall, efeito, 495
Tyrophagus dimidiatus, 143

U

Úlcera(s)
áreas necróticas da, 213
cutâneas, aspirados de, 213
Uranil, acetato de, 256
Uretrite, 184
Urina
concentrada, técnica da
pela centrifugação, 179
colheita da amostra, 180
controle de qualidade, 181
método, 181
observações, 181
reagentes, 180
pela membrana filtrante, 181
controle de qualidade, 184
hematoxilina de Harris, segundo Mallory, 182
método, 183
observações, 184
reagentes e materiais, 182
tríplice, 179
método, 179
reagentes e material, 179
exame de, 178
matinal, 464
sedimento centrifugado da, 193

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

sumário de, 389
Uronema nigricans, 147

V

Vagina, colheita de material de, com *swab* de algodão não absorvente com o auxílio de um espéculo não lubrificado, 186
Vaginal Identification of Pathogens, corante, 193
  amostra, 193
  características da coloração, 194
  coloração da amostra, 194
  preparações das soluções, 194
  reagentes, 194
Vahlkampfia
  lobospinosa, 146
  punctata, 146
Vaselina e parafina, *swab* de, 170
  método do, na pesquisa de *Enterobius vermicularis*, 169
    amostra e colheita, 169
    controle de qualidade, 169
    observações, 170
    preparação e método, 169
    reagentes, 169
VASPAR, método do
VDRL, teste do, 497
Velat-Weinstein-Otto, coloração de, 38
Verde de malaquita, 230
  solução aquosa de, 48, 231
    glicerinada, 135
Verme(s) adulto(s), 148
  de *Ancylostoma duodenale*, 703
  de *Angiostrongylus costaricensis*, 710
  de *Ascaris lumbricoides*, 158, 702
  de *Capillaria philippinensis*, 703
  de Echinococcus granulosus, 714
  de *Enterobius vermicularis*, 158, 703
  de *Fasciola hepatica*, 715
  de *Hymenolepis*
    diminuta, 713
    nana, 712
  de *Mansonella ozzardi*, 708
  de *Necator americanus*, 703
  de *Onchocerca volvulus*, 710
  de *Schistosoma mansoni*, 714
  de *Taenia*
    saginata, 711
    solium, 711
  de *Trichuris trichiura*, 702
  de *Wuchereria bancrofti*, 708
Vermelho de fenol, 741
Vírus
  da imunodeficiência humana (v. HIV)
  HIV, 74
Vitamina
  A, 476
  B_{12}, 400
  D, 476
  E, 476
  H, 476
  K, 476
Vittaforma corneae, 480

W

Weber, método de, 268
Weber-Ryan, métodos de, 5912
Weller-Dammin, técnica de, 58
Wells-Vail, solução de, 38
Western Blotting, método de, 503, 516, 543
Whatman, papel, 328
Wheatley
  método de, 100
    amostra, 100
    coloração da amostra, 101
    preparação das soluções, 101
    reagentes, 100
  tricrômico de, 38, 84
Willis, técnica de, 50, 53
Wright, coloração de, 296, 302
  controle de qualidade, 304
  preparação do corante, 303
  reagentes, 302
Wuchereria bancrofti, 291, 708
  características biológicas da, 383
  filarioses pela, 356
  microfilárias, 708
  vermes adultos, 708

X

Xenocultura, 316
Xenodiagnóstico
Xileno (Xilol), 250
Xilol (Xileno), 250, 360, 590, 658

Y

Yang e Scholten, método de, 105
  coloração da amostra, 106
  controle de qualidade, 106
  corante tricrômico, segundo Garcia e Bruckner, 105
  preparação
    da amostra, 106
    das soluções, 105
  reagentes, 105

Z

Zenker, fixador de, 738
Zeptomo, 501
Ziehl-Neelsen, métodos de coloração de, 235
  amostra, 235
  características da coloração, 237
  coloração da amostra, 236
  modificado, 590

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.

observações, 237
preparações das soluções, 236
reagentes, 235
Ziehl-Neelsen-Dimetilsulfóxido, método de coloração de, 239
amostra, 239
características da coloração, 241
controle de qualidade, 241
reagentes, 239
Ziemann, granulações de, 691
Zimodemos não-patogênicos, 36
Zinco, sulfato de, 55
solução de, 52
Zooparasitos, ovos de, 142

Esta obra faz parte do acervo da UNI-RN - Centro Universitário do Rio Grande do Norte

© Direitos reservados à EDITORA ATHENEU LTDA.