MANUAL DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

Disciplina Parasitologia clínica laboratorial

Profa. Gentilda K. F. Takeda

EXAME PARASITOLÓGICO DO SANGUE

Hemoscopia

Obtenção do sangue

A- Da micro-circulação superficial.

Finalidade: Preparação de esfregaços em lâminas ou outros processos que usem pequenas quantidades de sangue.

Material: Lanceta

Algodão ou gaze

Álcool 70% iodado

Local da punção: Ponta do dedo anelar esquerdo ou lóbulo da orelha. Em crianças pequenas, punciona-se a polpa do grande artelho.

Técnica de punção: Limpar, massageando o local com álcool iodado, deixando secar espontaneamente.

Puncionar firmemente com a agulha ou lanceta. Repetir a operação caso não atinja a profundidade desejada (2 a 3 mm).

Desprezar a primeira gota de sangue, aproveitando as seguintes para fazer o esfregaço.

B- Do sangue venoso.

Finalidade: Colhem-se, quando for necessário usar, volumes da ordem de mililitros.

Material: Seringa descartável com dimensão adequada à quantidade de sangue a ser colhido.

Agulha com calibre e comprimentos adequados.

Tubo estéril (com anticoagulante: citrato, heparina ou EDTA).

Algodão ou gaze.

Álcool iodado a 70%.

Para a pesquisa de tripanossomos e de microfilárias o exame a fresco é realizado em uma gota de sangue colocada em lâmina e coberta com lamínula. Pode-se utilizar, também, a técnica do microhematócrito quando a parasitemia é baixa.

Técnica do Microhematócrito

Esta técnica, descrita por Woo para o diagnóstico das formas sangüíneas de *Trypanosoma* spp, consiste na centrifugação do sangue com anticoagulante durante três minutos, em tubos capilares. Os parasitas do sangue (triptanosomas e microfilárias) podem ser visualizados, quando presentes, na região acima da camada leucocitária, em microscópio óptico.

Nestes exames podem-se observar os movimentos dos flagelados ou das microfilárias. Porém, para observação da morfologia dos parasitas faz-se necessária preparação de lâminas fixadas e coradas.

Para isso quebra-se a parte superior do capilar e, com auxílio de uma seringa de insulina aspira-se o conteúdo (constituído de plasma e parasitas) que fica logo acima do creme leucocitário. Com o conteúdo aspirado faz-se esfregaço em lâmina de vidro que deve ser fixado e corado com Giemsa.

Esfregaços de sangue e coloração de parasitas do sangue.

O esfregaço de sangue pode ser realizado de duas maneiras: esfregaço em camada delgada ou gota espessa.

No esfregaço de camada delgada a distorção do parasita é mínima (vantagem), mas há a desvantagem de ter que examinar muitos campos para se encontrar parasitas, quando estes estão em pequeno número.

Na gota espessa apesar da distorção das formas parasitárias ser maior, a probabilidade de detecção de parasitas aumenta porque a quantidade de sangue a ser examinada é cerca de três ou quatro vezes maior do que o esfregaço e a área examinada (1cm²) menor. Esfregaços de sangue ou gota espessa, com sangue capilar, devem ser feitos com gota de fluxo espontâneo e não contaminado com álcool.

Estas técnicas são utilizadas para a pesquisa e o diagnóstico dos parasitas da malária, tripanossomos, microfilárias, babésias, tripanossomas e *Leishmania chagasi*.

CORANTES

Os derivados do Romanowsky são os mais utilizados; Destes os mais comuns são o Giemsa e o Leishman.

Giemsa (solução estoque)

Azur II eosina	0,30g
Azur II	0,08g
Glicerina P.A.	12,50 ml
Álcool metílico P.A.	37,50 ml

Esta solução pode ser preparada em laboratório ou comprada pronta.

Ao usá-la, esta deve ser diluída em água da seguinte forma: três gotas de corante-estoque para cada 02 ml água.

Leishman

O corante de Leishman é uma mistura de azul de metileno e eosina, pode ser adquirido no comércio e é um pó.

Azul de metileno e eosina (pó)	0,15g
Álcool metílico P. A	100 ml.

Para preparar o corante, o pó é dissolvido em álcool metílico agitando-se frequentemente, durante três dias. Devem-se guardar ambos os corantes (Giemsa e Leishman) em vidros âmbar e em ambiente escuro.

Preparação do esfregaço

Para a confecção de esfregaço (em camada delgada e gota espessa) devem-se utilizar lâminas de vidro limpas e desengorduradas

Esfregaço em camada delgada

Uma pequena gota de sangue é colocada próximo de uma extremidade da lâmina; com auxílio de outra lâmina (segurar por cima com a mão direita), em ângulo de 30°, colocada adiante da gota, o sangue vai se espalhar pela superfície de contato das duas lâminas. Com suavidade e rapidez deslizar esta segunda lâmina para frente de modo a espalhar o sangue até o fim da lâmina. Deixar secar ao ar. Fixar e corar.

Esfregaço em gota espessa

Colher 2 a 3 gotas de sangue em uma lâmina. Utilizando o canto de outra lâmina, espalhar o sangue numa camada circular com 15 mm de diâmetro. Deixar secar ao ar por uma noite. Colocar a lâmina com a gota espessa num recipiente com água para a desmembramento (lise) das hemácias. Com a ruptura das hemácias a cor vermelha da hemoglobina desaparece da mancha de sangue e dá lugar a uma área esbranquiçada. Retirar a lâmina com cuidado e deixar secar. Fixar e corar.

Fixação do material e coloração

Existem vários fixadores disponíveis, porém o mais utilizado é o álcool metílico.

Para a fixação deve-se cobrir a lâmina com álcool metílico (PA) e deixar fixando por um minuto. Em seguida cobrir o esfregaço com corante Giemsa diluído, deixando-o agir por 30' minutos. Escorrer o corante e lavar em água corrente; deixar secar e examinar em microscópio.

Se o corante utilizado for o de Leishman proceder da seguinte maneira: cobrir o esfregaço com sete ou oito gotas de corante; deixar o corante agir durante 15 segundos (no máximo), em seguida adicionar 15 gotas de água; com auxílio de uma pipeta homogeneizar (soprando o corante) a mistura. Deixar corar por 20 minutos, escorrer o corante, lavar em água corrente, deixar secar e examinar em microscópio.

O esfregaço corado pelo Leishman não necessita de fixação prévia pelo álcool metílico, pois este já faz parte da fórmula do corante. As lâminas coradas por este método não são tão boas e duráveis quanto pelo método de Giemsa, no entanto, é uma técnica muito utilizada devido à rapidez e facilidade de execução.

Técnica de Knott (pesquisa de microfilárias).

- 1- Retirar 02 ml de sangue total por punção venosa e colocar imediatamente em um tubo contendo 10 ml de formol a 2%.
- 2- Fechar o tubo e misture completamente, invertendo-o e agitando-o. O formol hemolisa as hemácias; mata, fixa e distende as microfilárias
- 3- Centrifugar o sangue a 1500 rpm por 5 minutos.
- 4- Decantar o sobrenadante.
- 5- Retirar o sedimento com uma pipeta Pasteur e o espalhe numa gota espessa sobre uma lâmina.
- 6- Deixar secar bem e corar com Giemsa.
- 7- Examinar com objetiva de imersão.

Exame de fezes

1- Receber as fezes em recipiente adequado.

2- As amostras devem ser corretas e completamente identificadas com: o nome do paciente; idade, número de identificação do laboratório; hora da colheita e hora da chegada da amostra ao laboratório.

As instruções, sobre a coleta de fezes devem ser claras e passadas ao paciente. É importante verificar se o paciente as entendeu, pois é na coleta adequada que se inicia a qualidade do exame parasitológico.

3- Para um trabalho rotineiro em Parasitologia é recomendável que se realize três exames parasitológicos.

4- Todos os parasitas observados devem ser relatados pelo nome científico, incluindo gênero e espécie, quando possível, e o estágio que estão. Determinados elementos celulares (GV, GB ou outras células), fungos ou cristais de Charcot-Leyden devem ser assinalados de modo semiquantitativo como: poucos cristais, moderados ou muitos. Também, deverão constar os métodos executados e a consistência das fezes.

5- Fezes líquidas devem ser examinadas dentro de 30 minutos; semi-sólidas dentro de 1 hora e formadas dentro de 24 horas. Se o exame for realizado depois de 24 horas a amostra deve ser mantida em conservadores tais como: formol a 10%, álcool polivinílico (PVA); o MIF conservador muito difundido composto de mertiolato ou mercurocromo, iodo e formol e o SAF que é um fixador usado para conservar cistos e trofozoítos.

A proporção utilizada é de três partes de qualquer um dos conservadores para uma parte de fezes. Essa mistura deve ser bem homogeneizada.

* O formol e o MIF preservam ovos, cistos e trofozoítos para exames a fresco; PVA e o SAF preservam trofozoítos para coloração permanente.

Formol a 10%

Formol comercial 10ml.

Solução salina a 0,85% 90ml.

Fixador Álcool Polivinílico (PVA)

Utilizada para conservar e transportar fezes líquidas. A proporção adequada é de 2 a 3ml. de fezes para 8 a 10ml. de solução de PVA.

*Bicloreto de mercúrio,
 Solução aquosa saturada 312ml.
 Álcool etílico a 95% 156ml.
 Ácido acético glacial 25ml.
** PVA em pó 20g.
 Glicerina 7,5ml.

* Preparar o bicloreto de mercúrio dissolvendo 130 a 140 g. de sal em 1000 ml de água destilada. Aqueça para dissolver, após o resfriamento filtre e estoque em uma garrafa.

** Coloque o PVA em pó no álcool agitando lentamente. Aqueça a 75°C (banho Maria) e agite até que a solução fique transparente. Acrescente os outros reagentes e deixe esfriar. Guarde em um frasco fechado e use conforme a necessidade. Decante a solução sem suspender o sedimento.

MIF

 Água destilada 250ml.
 Sol. mercuriocromo a 1:500 250ml.
 Formol 25ml.
 Glicerina 5ml.

SAF

 Acetato de sódio 1,5g
 Ácido acético 2,9ml.
 Formol 40% 4,0ml.
 Água destilada 92,5ml.

5- Rejeitar fezes contendo meio de contraste para Raios X (sais de bário), somente colher as fezes 5 a 10 dias após a ingestão de sais de bário.

6- Não administrar purgativos tais como: óleo mineral, óleo de castor ou supositórios, porque é impossível pesquisar protozoários.

EXAME MACROSCÓPICO

Procedimentos

1- Observar a consistência da amostra.

Fezes moles ou líquidas sugerem a possível presença de trofozoítos de protozoários intestinais. Cistos de protozoários são encontrados com mais freqüência em fezes formadas. Ovos e larvas de helmintos podem ser encontrados tanto em fezes líquidas quanto em fezes formadas.

2- Examinar a superfície da amostra para observar a presença de proglotes de tênias, ancilostomídeos ou oxiúros adultos, por exemplo.

3- Examinar a amostra fecal com auxílio de um palito (sorvete) para verificar a presença de outros helmintos adultos.

4- Examinar as fezes quanto à presença de sangue e/ou muco.

a) sangue fresco (vermelho vivo) indica hemorragia aguda no trato intestinal.

b) muco sanguinolento sugere ulcerações e uma porção desse material deve, de preferência, ser examinada, ao microscópio, para a procura de trofozoitos.

Os vermes adultos, quando encontrados, devem ser imediatamente examinados e identificados.

As tênias são identificadas especificamente pelo exame das proglotes grávidas. As proglotes devem ser fixadas em formol a 10% e depois clarificadas por imersão em glicerina ou solução de lactofenol (1:1).

EXAME MICROSCÓPICO

Permite a visualização de trofozoitos, cistos e oocistos de protozoários e de ovos e larvas de helmintos.

É recomendável, quando se trata de fezes diarréicas ou disentéricas, o emprego dos seguintes procedimentos:

a) exame direto a fresco para observação dos movimentos dos trofozoitos,

b) seguido de feitura de esfregaço de fezes com coloração permanente para observação morfológica dos trofozoítos, especialmente, de amebas

O exame de fezes pode ser **quantitativo** ou **qualitativo**. Os métodos quantitativos são aqueles nos quais se faz contagem de ovos para avaliação da carga parasitária. O mais conhecido é o de Stoll, mas, o mais empregado atualmente é o de Kato-Katz.

Os métodos qualitativos são os mais utilizados para a demonstração da presença das formas parasitárias. Frequentemente o número das formas parasitárias é pequeno, assim é necessário recorrer a processos de enriquecimento dessas formas para concentrá-las.

Os principais métodos de enriquecimento ou de concentração utilizados são:

Sedimentação espontânea: método de Hoffmann, Pons e Janer ou método de Lutz. Este método permite o encontro de ovos e larvas de helmintos, cistos e oocistos de protozoários;

Sedimentação por centrifugação: Método de Blagg, conhecido por MIFC; Método de Ritchie, e o Coprotest. Usados para a pesquisa de cistos de protozoários e de ovos e larvas de helmintos.

Flutuação: Método de Willis. Indicado para pesquisa de ovos leves (ancilostomídeos).

Centrífugo-flutuação: Método de Faust. Utilizado para pesquisa de cistos e oocistos de protozoários e de ovos leves.

Concentração de larvas de helmintos: Método de Baermann-Moraes e o método de Rugai usados para pesquisa de larvas de *Strongyloides stercoralis*.

As fezes enviadas ao laboratório clínico devem ser submetidas a um desses métodos citados. Como não existe um método muito sensível capaz de diagnosticar, ao mesmo tempo, todas as formas parasitárias o que se faz de rotina é o emprego de um método geral como o de Lutz ou de Hoffmann, Pons e Janer (de fácil execução e pouco dispendioso), um específico para cistos de protozoários e um para a pesquisa de larvas de helmintos.

Exame direto a fresco

- 1- Colocar duas a três gotas de salina a 0,85% em uma lâmina de vidro.
- 2- Tocar com a ponta de um palito em vários pontos das fezes, transferindo uma pequena porção para a lâmina de microscopia.
- 3- Espalhar as fezes, fazendo um esfregaço e examinar ao microscópio. A espessura do esfregaço não deve impedir a passagem de luz.
- 4- Este método é indicado principalmente para a pesquisa de trofozoitos de protozoários em fezes diarréicas recém emitidas; para a identificação de cistos de protozoários e larvas de helmintos cora-se a preparação com Lugol. O uso de lamínula é facultativo.

Solução de Lugol

Iodo	2g
Iodeto de potássio	4g
Água destilada	100ml

Método de Lutz ou de Hoffmann, Pons e Janer (sedimentação espontânea).

- 1- Colocar aproximadamente 2g de fezes em um frasco de Borrel ou em um copo plástico descartável, com cerca de 5 ml de água e dissolver bem com auxílio de um palito de sorvete descartável.
- 2- Acrescentar mais 20 ml de água
- 3- Coar a suspensão (para isto, usa-se gaze cirúrgica umedecida, dobrada em quatro, e colocada em um coador de plástico pequeno) num cálice cônico de 200 ml de capacidade. Os detritos retidos na gaze são lavados com mais 20 ml de água.
- 4- Completar o volume do cálice com água.
- 5- Deixar essa suspensão em repouso durante duas a 24 horas.
- 6- Desprezar o líquido sobrenadante cuidadosamente, homogeneizar o sedimento e coletar uma porção do mesmo.
- 7- Colocar parte do sedimento numa lâmina, corar com Lugol e cobrir com lamínula (facultativo). Examinar no mínimo duas lâminas de cada amostra.

Método de MIFC ou de Blagg (sedimentação por centrifugação).

- 1- Coletar as fezes recém emitidas em líquido conservador de MIF.
- 2- Homogeneizar bem.
- 3- Coar a suspensão em gaze cirúrgica dobrada em quatro num copo descartável.
- 4- Transferir 1 a 2 ml do filtrado para um tubo cônico com capacidade para 15ml.
- 5- Acrescentar 4 a 5 ml de éter sulfúrico e agitar vigorosamente (desengordura a amostra fecal).
- 6- Centrifugar por um minuto a 1.500 rpm.
- 7- Com auxílio de um bastão, descolar a camada de detritos gordurosos da parede do tubo.
- 8- Inverter o tubo para desprezar o líquido e limpar as paredes com um bastão contendo algodão na extremidade.
- 9- Acrescentar ao sedimento gotas de Lugol.
- 10- Coletar 2 a 3 gotas do sedimento, cobrir com lamínula e examinar com as objetivas 10x e/ou 40x.

Método de Ritchie modificado ou formol-acetato de etila.

- 1- 5 a 15g de fezes (uma colher de chá) de fezes recentes são homogeneizados em 10 a 15 ml de formol a 10%, em um frasco Borrel, com auxílio de um bastão ou palito.
- 2- Coe a mistura com gaze umedecida e dobrada em quatro e a transfira para um tubo cônico de centrífuga. (Não coar amostra que contenha grande quantidade de muco. Neste caso, centrifugar a mistura a 1500 rpm por 10 minutos, desprezar o sobrenadante e examinar o sedimento).
- 3- A suspensão é centrifugada, várias vezes, a 500g (1500 rpm.) 1 minuto, até se obter um sobrenadante claro.
- 4- O sobrenadante é desprezado e o sedimento ressuspenso em 4 ml de acetato de etila. Arrolhe o tubo e agite o tubo vigorosamente por 30 segundos. Retire cuidadosamente a rolha do tubo, pois o vapor formado pode provocar um jato de detritos fecais. Esta etapa remove as gorduras das fezes.
- 5- Centrifugar o tubo novamente. Há formação de 4 camadas: a de acetato de etila (a mais superficial); detritos fecais; formol e o sedimento contendo os parasitas (no fundo do tubo).

6- Depois que a camada de detritos for retirada com um bastão, todo sobrenadante é descartado, virando o tubo de centrífuga com movimento suave, mas de uma só vez.

7- O sedimento é homogeneizado, agitando o tubo entre os dedos. Uma gota de sedimento fecal é misturada com uma gota de Lugol e levada para exame ao microscópio.

É importante ressaltar que o acetato substitui o éter. É mais seguro por não ser inflamável, porém, ele pode dissolver tubos de plástico. O acetato em excesso aparece como bolhas quando se faz a lâmina.

Coprotest

É um processo simplificado e seguro de sedimentação por centrifugação.

O paciente adquire na farmácia o Coprotest que já vem com o conservador (formol a 10%), coloca as fezes no coletor, fecha o frasco e agita por 2 minutos para homogeneizar e as envia para o laboratório.

A amostra de fezes homogeneizada é recolhida em um tubo de centrífuga, acrescenta-se 3 ml de acetato de etila ou éter, agita-se e a mistura é centrifugada por 3 minutos. Desprezando-se os detritos e o líquido sobrenadante e acrescenta-se uma gota de Lugol ao sedimento. Duas ou três gotas do sedimento são recolhidas numa lâmina, cobertas com lamínula e examinadas ao microscópio.

Método de Faust (centrífugo-flutuação em sulfato de zinco)

1- Diluir 10g de fezes em 20 ml de água

2- Homogeneizar bem.

3- Filtrar em gaze dobrada em quatro, num copo plástico, e transferir para um tubo de Wasserman.

4- Centrifugar por um minuto a 2.500 rpm.

5- Desprezar o líquido sobrenadante e ressuspender o sedimento em água

6- Repetir as operações 4 e 5 até que o sobrenadante fique claro.

7- Desprezar o sobrenadante claro e ressuspender o sedimento com uma solução de sulfato de zinco a 33%, densidade de 1,18 g/ml.

8- Centrifugar novamente por um minuto a 2.500 rpm.

9- Os cistos e os ovos leves presentes estarão na película superficial; a mesma é recolhida com alça de platina, colocada numa lâmina junto com uma gota de Lugol e coberta com lamínula.

O material deve ser examinado imediatamente. O sulfato de zinco pode deformar os cistos.

Método de Willis

1- Colocar 10g de fezes num frasco de Borrel ou no próprio recipiente onde estão as fezes

2- Homogeneiza-las com um pouco de solução saturada de sal (NaCl) ou de açúcar

3- Completar o volume até a borda do frasco.

4- Colocar na boca do frasco uma lâmina, que deverá estar em contato com o líquido.

5- Deixar em repouso por 5 minutos.

6- Findo esse tempo, retirar rapidamente a lâmina, deixando a parte molhada voltada para cima.

7- Cobrir com lamínula, corar com Lugol e examinar com objetiva 10x.

Método de Baermann-Moraes

1- Colocar 8 a 10g de fezes numa gaze dobrada em quatro sobre um funil de vidro, contendo um tubo de borracha conectado à extremidade inferior de sua haste.

2- Obliterar o tubo de borracha com um pinça de Hoffman e adicionar, ao funil, água aquecida (45°C) em quantidade suficiente para entrar em contacto com as fezes.

3- Deixar uma hora em repouso.

4- Colher 5 a 7 ml da água em um tubo de centrífuga, abrindo-se a pinça.

5- Centrifugar um minuto a 1.000 rpm.

6- Coletar o sedimento, corar com Lugol e examinar ao microscópio com objetiva 40x.

Método de Rugai

- 1- Retirar a tampa do recipiente que acondiciona as fezes e envolvê-lo em tergazes, fazendo uma pequena "trouxa".
- 2- Colocar o material assim preparado, com a abertura voltada para baixo, num cálice de sedimentação, contendo água aquecida (45°C), em quantidade suficiente para entrar em contato com as fezes.
- 3- Deixar em repouso por uma hora
- 4- Coletar o sedimento no fundo do cálice, com ajuda de uma pipeta.
- 5- Corar as larvas com Lugol e observá-las com o maior aumento para identificá-las.

Fezes diarréicas (as larvas morrem muito rapidamente) ou coletadas em conservador não se prestam para esses métodos.

Método de Kato-Katz (Método de Kato modificado por Katz e cols.).

- 1- Preparar uma **solução de verde de malaquita** de acordo com a seguinte fórmula:

Glicerina	100 ml
Água destilada	100 ml
Verde malaquita a 3%	1 ml

Essa solução conserva as fezes e clarifica as formas parasitárias.

- 2- Cortar papel celofane semipermeável em pedaços de 24 mm por 30 mm e deixá-los mergulhados na solução de verde-malaquita por pelo menos 24 horas.
- 3- Colocar, sobre um papel, uma pequena quantidade da amostra fecal.
- 4- Comprimir as fezes com um pedaço de tela metálica (marca Ibras, nº 120, fios e trama: 0,09mm) ou similar de náilon.
- 5- Retirar as fezes que passaram para a parte superior da tela e transferi-la, com o auxílio de um palito, para o orifício (6 mm de diâmetro) de um cartão retangular de plástico, colocado sobre uma lâmina de vidro.
- 6- Após encher completamente o orifício, retirar o cartão cuidadosamente, deixando as fezes (42 mg) sobre a lâmina.
- 7- Cobrir as fezes com o papel celofane. Inverter a lâmina sobre uma folha de papel e comprimi-la.

8- Após uma hora, examinar ao microscópio contando os ovos presentes na preparação.

9- O número de ovos encontrados, na preparação fecal, multiplicado por 23, corresponderá ao nº de ovos por grama de fezes.

Na rotina laboratorial usa-se, com maior frequência, o método qualitativo. Assim, não há necessidade de se utilizar o cartão retangular.

Este método é indicado para pesquisa de ovos de *S. mansoni*, *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e *Ancylostomidae*. Cistos de protozoários não são visualizados nessa preparação.

Não é possível a execução deste método em fezes diarréicas.

Outros procedimentos de diagnóstico.

Método de Henriksen e Pohlenz (pesquisa de oocistos)

Nos últimos anos, parasitas intestinais como: *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli*, *Cyclospora cayetanensis* e os microsporídeos vêm causando doenças diarréicas graves em pacientes imunodeprimidos. Como esses parasitas podem ser de difícil identificação pelos métodos usuais de rotina, impõe-se utilização do método de coloração ácido-resistente para a sua pesquisa.

Para execução desse método, as fezes (frescas, preservadas em formol a 10% ou em SAF) deverão ser previamente concentradas pelo método de MIFC ou de acetato de etila, aumentando-se o tempo de centrifugação para 10 minutos. Fezes preservadas em PVA não apresentam bons resultados. Métodos de sedimentação pelo formol-éter ou centrífugo-flutuação com solução saturada de sacarose ou solução de Sheather também são utilizados para concentrar os oocistos.

1- Preparar um esfregaço delgado com parte do sedimento obtido após centrifugação.

2- Deixar secar a temperatura ambiente.

3- Fixar com álcool metílico por 5 minutos.

4- Deixar secar a temperatura ambiente.

5- Corar com o corante de Kinyoun (a frio), durante uma hora.

- 6- Lavar em água corrente.
- 7- Diferenciar com solução aquosa de ácido sulfúrico a 2% (30 segundos a um minuto) até que não saia mais corante da lâmina.
- 8- Lavar em água corrente.
- 9- Corar o fundo com solução de verde malaquita a 5%, por 8 minutos.
- 10- Lavar em água corrente e secar.
- 11- Examinar com objetiva de imersão.

Corante de Kinyon (solução salina de fucsina fenicada)

Solução A

Fucsina básica	1,5g	
Álcool etílico a 95% (v/v)		100ml

Solução B

Fenol (fundido a 44°C)	5g	
Água destilada deionizada q.s.p.		100ml

Solução corante

Solução A	10ml
Solução B	90ml

Filtrar a solução e armazenar a temperatura ambiente. Estável por um ano.

Pesquisa de trofozoítos de *T. vaginalis*

Trichomonas vaginalis encontra-se entre os mais prevalentes dos protozoários, propagando-se pelo contato sexual. Geralmente, o diagnóstico da vaginite por *T. vaginalis* é feito identificando o parasito na secreção vaginal. Os trofozoítos apresentam-se com movimentos de contorção com auxílio dos flagelos muito ativos. São vistos em preparações, à fresco, de secreções vaginais em cerca de 60% das mulheres infectadas.

A técnica empregada consiste na coleta de um pouco de secreção vaginal, recolhida preferivelmente com pipeta grossa e após colocação do espelho. A secreção é misturada com soro fisiológico em uma lâmina, cobrir com lamínula e examinar ao microscópio.

Nos homens, uma preparação a fresco do material obtido por raspado com uma alça de platina da uretra anterior revela o microorganismo em cerca de 60%

dos casos. A pesquisa também é feita no sedimento urinário. A massagem prostática antes da coleta da urina para a cultura da *Trichomonas* é a abordagem diagnóstica mais sensível.

Se os parasitos forem pouco abundantes e o exame a fresco negativo, deve-se semear o material no meio de cultura. Como os flagelados sobrevivem pelo menos 24 h na secreção vaginal diluída com solução de Ringer, não é necessário fazer a semeadura imediatamente. Inocular no tubo de cultura o sedimento obtido por centrifugação. Aconselha-se suspender a aplicação local de quaisquer desinfetantes ou de anticoncepcionais de natureza química alguns dias antes da coleta. A cultura é o método mais sensível de diagnóstico e existem, atualmente, *kits* comerciais.

Meio de Kupferberg

Empregado na cultura e isolamento de *Trichomonas vaginalis*.

Tripticase (BBL)	20,0 g
Cisteína (cloridrato)	1,5 g
Maltose	1,0 g
Ágar	1,0 g
Água destilada	q.s.p. 950,0 ml.

- 1- Aquecer a mistura em banho-maria, até a dissolução do ágar, acertar o pH a 6.
- 2- Filtrar (à quente) em papel de filtro de porosidade adequada (Reeve-Angel nº 845, p. ex.) e juntar 0,6 ml de uma solução de azul de metileno a 0,5% para servir de indicador.
- 3- Depois de resfriar ligeiramente (em torno de 45° C), reajustar o volume para 50 ml, com água destilada, em pH 6.
- 4- Distribuir o meio em tubos de ensaio (colocando 9,5 ml em cada um) e esterilizá-los em autoclave.
- 5- Depois de resfriarem naturalmente, adicionar a cada tubo 0,5 de soro humano estéril.

Pesquisa de *Leishmania* spp.

Nas Leishmanioses Tegumentares devem ser pesquisados os parasitos mediante biópsia ou raspagem das lesões cutâneas ulceradas, especialmente na borda da úlcera, junto à base, após a completa limpeza da lesão. Melhor ainda e mais cômoda é a punção da borda inflamada, bem como das lesões não ulceradas, mediante aspiração com agulha fina. Também se pode injetar um pouco de soro fisiológico no tecido lesado e aspirá-lo, em seguida, para preparar uma lâmina fixada e corada.

As úlceras novas são ricas de parasitos que, depois, vão se tornando raros. Os amastigotas serão vistos no interior dos macrófagos ou espalhados na lâmina, quando estes se rompem.

Com o material de biópsia faz-se impressão ou "imprint" (por aposição) sobre lâminas de microscopia e corá-la com Giemsa, para exame ao microscópio ou se utiliza para a preparação de cortes histológicos.

Na Leishmaniose visceral o encontro do parasito constitui requisito básico para o diagnóstico. A sorologia é útil para uma triagem de casos, quando for difícil demonstrar a presença de leishmânias, geralmente, no início da infecção ou em formas benignas e autolimitantes.

O material para exame pode ser coletado de vários órgãos como:

1- Punção das vísceras. Os parasitos podem ser encontrados no material aspirado do baço (98% dos casos dão resultados positivos), da medula óssea (54 a 86% de positivos) ou de linfonodos aumentados de volume (64% dos casos).

Alguns autores recomendam a punção do baço como método de escolha, porém a maioria prefere a punção do esterno (em adultos) ou da crista ilíaca (em crianças), para evitar os riscos de ruptura do baço e hemorragia interna.

Com o material aspirado, preparar esfregaço em camada delgada na lâmina de vidro, fixar e corar com Giemsa ou por método equivalente.

2- Sangue. Elas podem ser encontradas, eventualmente, no interior de monócitos, devendo a pesquisa ser feita no creme leucocitário, obtido por centrifugação de amostras de sangue em tubo capilar. Fixar e corar com Giemsa.

3- Pele. Esta pesquisa não faz parte da rotina diagnóstica, devido à escassez de parasitos na pele, exceto nos casos de leishmaniose dérmica pós calazar (difusa). Com o material obtido faz-se um esfregaço ou, no caso de biópsia,

uma impressão sobre lâmina de microscopia. O material é fixado com álcool metílico e corado com Giemsa.

Cultura em meio NNN.

A escassez de parasitos sempre dificulta a sua busca ao microscópio assim, o material suspeito como raspado de lesão, sangue ou aspirado de punção (nos casos de Leishmaniose Tegumentar e Visceral) deve ser semeado no meio NNN. Os meios de cultura (incubados a 24° - 26°C) deverão ser examinados 5, 7, ou 10 dias depois; mas, caso sigam negativos, repicar para novo meio após 15 dias. A inoculação em animal de laboratório (hamster) é bastante sensível, porém não é prática porque requer meses para positivar.

Meio de NNN (Novy, McNeal e Nicolle) para leishmânias.

É um meio difásico, compreendendo uma base nutritiva sólida e inclinada de ágar-sangue de coelho e uma porção líquida, resultante da água de condensação que se acumula durante o resfriamento do meio, onde crescem os flagelados.

Em um balão de vidro, misturar:

Cloreto de sódio	6 g
Agar	14 g
Água destilada	900 ml.

Aquecer até dissolver o ágar. Distribuir a mistura em frascos de cultura e esterilizá-los. Assim podem ser mantidos à temperatura ambiente até a ocasião de usar, quando cada recipiente será colocado em banho-maria para que a gelose se funda. Deixar que a temperatura do meio de cultura atinja cerca de 50°C e adicionar sangue de coelho desfibrinado na proporção de 15%, agitando suavemente para assegurar mistura completa. Deixar solidificar, mantendo os tubos inclinados. Ao líquido de condensação deve-se adicionar antibiótico (gentamicina p.ex.) para prevenir contaminação bacteriana.

Meio LIT

Este meio, que serve para tripanossomos e leishmânias, é designado pelas iniciais de Liver Infusion Tryptose. Quando usado para cultura de leishmânias, ele deve constituir a fase líquida do meio, sobre uma base sólida do meio NNN.

Em um balão de vidro de 1.000 ml, colocar

NaCl	4,0 g
KCl	0,4 g
Na ₂ PO ₄	8,0 g
Glicose	2,0 g
Triptose	5,0 g
Infusão de fígado	5,0 g
Água destilada	800,0 ml.

A infusão de fígado (Liver infusion da Difco ou Oxford) é dissolvida em banho-maria, durante 10 minutos em ebulição. Filtrar em papel de filtro. Acertar o pH para 7,2 com solução de HCl 2N. Ao filtrado, juntar 100 ml de soro bovino e colocar em banho-maria a 68°C durante uma hora. Deixar esfriar e adicionar 20 ml de hemoglobina de boi.

Para conservá-lo, é conveniente distribuir o meio em frascos de Erlenmeyer de 125 ml (30 ml por frasco) e guardá-lo em freezer. Antes de usá-lo, descongelar à temperatura ambiente e fazer o teste de esterilidade em estufa a 28°C.

Método de Graham ou da fita gomada (swab anal)

Este método é utilizado para pesquisa de ovos de *Taenia solium*, *T. saginata* e de *Enterobius vermicularis*. Esta técnica deve ser feita pela manhã, antes que o paciente defeque ou tome banho, e repetida, em dias sucessivos, caso dê negativo.

1- Fixar, em uma lâmina, uma tira de 5 a 6 cm de fita durex transparente, colocando, nas duas extremidades, tiras de papel de aproximadamente 4cm. (as quais servirão de suporte para segurar e para identificação do material).

2- Destacar a fita da lâmina e colocar sobre o fundo de um tubo de ensaio ou ao redor de um abaixador de língua com o lado aderente voltado para fora.

3- Afastar as nádegas e aplicar a superfície aderente da fita na região perianal, fazendo movimento de vaivém para tocar o máximo possível na mucosa perianal.

4- Remover a fita e distendê-la sobre uma lâmina de microscopia, com o lado aderente voltado para baixo. Pressionar firmemente para evitar que fiquem bolhas de ar.

4- Examinar ao microscópio com objetivas 10x e 40x.

Coloração de trofozoítos intestinais pela hematoxilina férrica (Técnica modificada por Corrêa e cols. 1994)

Reagentes

1- Líquido de Schaudinn (fixador)	
Solução saturada de bicloreto de mercúrio	200 ml
Álcool a 95%	100 ml

No momento de uso adicionar 2,5 ml de ácido acético para cada 50 ml.

2- Alúmen de ferro a 2,5%

Triturar os cristais de alúmen de ferro em *Graal* e diluir aos poucos com água destilada. Completar o volume.

3- Hematoxilina a 0,5%

Hematoxilina	0,5 g
Álcool a 95%	10 ml
Água destilada	90 ml

Diluir a hematoxilina no álcool e acrescentar a água destilada. Após 72 horas de maturação, o tempo de exposição do material a ser corado, deverá ser de três minutos.

4- Álcool-salicilato

Álcool absoluto p.a.	100 ml
Salicilato de metila	100 ml

Técnica

- 1) Filtrar as fezes, conservadas em Schaudinn ou SAF, em gaze dobrada quatro vezes.
- 2) Transferir cerca de 2 ml para um tubo e centrifugar por um minuto a 1.500 rpm.
- 3) Desprezar o sobrenadante, acrescentar solução salina a 0,85%, homogeneizar e centrifugar novamente.
- 4) Repetir a operação até obter um sobrenadante límpido
- 5) Desprezar o sobrenadante e acrescentar, ao sedimento, duas gotas de soro humano inativado.
- 6) Misturar bem e fazer esfregaços finos sobre lamínulas. A lamínula deve ser presa a um suporte de borracha pequeno (pode ser utilizada a borracha que serve de rolha em vidro de penicilina) por meio de um entalhe, para facilitar o manuseio e a identificação do material. Desta forma, é possível a coloração de várias amostras ao mesmo tempo.
- 7) Sem deixar secar o esfregaço, colocar a lamínula com o esfregaço voltado para baixo, em uma placa de Petri contendo o fixador de Schaudinn com 5% de ácido acético por 10 minutos.
- 8) Passar a lamínula com o esfregaço voltado para cima para as placas de Petri subseqüentes, contendo os seguintes reagentes:
 - a) álcool 70% (para retirar o excesso de fixador) 2 minutos
 - b) álcool 70% iodado, isto é, contendo algumas gotas de tintura de iodo até atingir a cor de vinho do porto (para reagir com o mercúrio) 5 minutos
 - c) álcool 70% (para precipitar o mercúrio) 2 minutos
 - d) lavar em água destilada (para retirar o excesso de mercúrio) 1 minuto
 - e) alúmen de ferro 2,5% (mordente que fixa o corante) 10 minutos
 - f) lavar em água destilada (para retirar o excesso de ferro) 1 minuto
 - g) hematoxilina 0,5% (corante) 5 minutos
 - h) lavar em água destilada (para retirar o excesso do corante) 5 minutos
 - i) alúmen de ferro 2,5% (diferenciador). Obs: O esfregaço deve permanecer nessa solução até atingir uma coloração lilás clara azulada.
 - j) lavar em água destilada 1 minuto
 - k) álcool 70% (desidratar) 2 minutos
 - l) álcool 80% (desidratar) 2 minutos

- m) álcool 95% (desidratar) 2 minutos
- n) álcool absoluto (desidratar) 2 minutos
- o) álcool-salicilato (para preparar o material para diafanizar) 2 minutos
- p) salicilato de metila 2 minutos

9) Montar em lâmina de vidro com bálsamo-do-canadá ou em resina sintética com o esfregaço voltado para baixo.

10) Deixar secar e examinar com objetiva de imersão.

Referências bibliográficas

1. DE CARLI, G. A. **Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas.** 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2007.
2. NEVES, D. P. **Parasitologia Humana.** 9º e 10º ed - São Paulo: Atheneu, 1998 e 2000
3. REY, L. **Bases da Parasitologia médica.** Rio de Janeiro -2º ed. -: Guanabara-Koogan, -1992.
4. CHIEFFI, P. P. **Parasitoses intestinais: diagnóstico e tratamento.** São Paulo: Lemos Editorial, 2001.
5. LEVENTHAL, R.; CHANDLER, R. **Parasitologia Médica.** São Paulo: Editora Premier, 1997.
6. TIERNEY, L.M.; MCPHEE, S. J. & PAPADAKIS, M. A. **Diagnóstico & Tratamento.** São Paulo: Atheneu Editora São Paulo Ltda, 2004.
7. GOLDMAN, L & BENNETT, J.C. **Cecil Tratado de Medicina,** 21ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.