



Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo



Exame parasitológico de fezes

Conceitos gerais



Arthur Gruber

Exame parasitológico de fezes



Objetivo:

- Identificar estágios de parasitas eliminados pelas fezes
 - Ovos de helmintos
 - Cistos e trofozoítos de protozoários

Exame parasitológico de fezes



Colheita:

- Colocar as fezes em recipiente fechado
- Identificar o frasco com etiqueta:
 - Nome do paciente
 - Espécie animal, raça e idade
 - Data e hora da colheita



Exame parasitológico de fezes



Colheita:

- Levar imediatamente ao veterinário ou armazenar em geladeira
 - Conservação de cistos e trofozoítos de protozoários
 - Evita desenvolvimento de embriões de helmintos → larvas



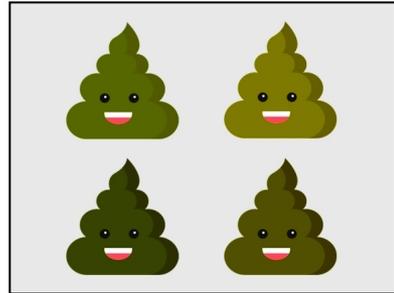
Ovos de *Toxocara cati*
em estágio de mórula e
larvado

Exame parasitológico de fezes



Exame macroscópico:

- Consistência das fezes
- Coloração
- Presença de parasitas visíveis (proglótides de cestoides, helmintos adultos)
- Presença de muco, sangue





Exame direto a fresco

Exame direto a fresco



Princípio:

- Teste **qualitativo** para a detecção de ovos de helmintos e estágios de protozoários



Cistos de *Giardia*



Trofozoíto de *Giardia*



Ovos de *Ancylostoma*

Exame direto a fresco



Método:

- Colocar uma pequena quantidade de fezes em uma lâmina de microscopia.
- Colocar uma gota de solução salina (0,85% NaCl) ou água nas fezes e misturar bem com uma espátula ou bastão.
- Cobrir com uma lamínula. A suspensão deve ter espessura fina o suficiente para permitir a passagem da luz
- Para melhorar a visualização, pode-se pingar uma **solução de lugol** (iodo/iodeto de potássio)
- Inspeccionar a lâmina em movimentos de ida e volta

Exame direto a fresco



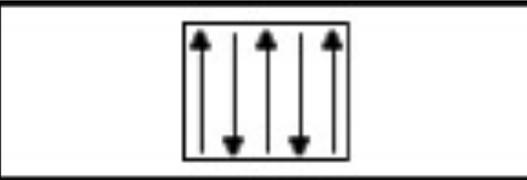
Método:



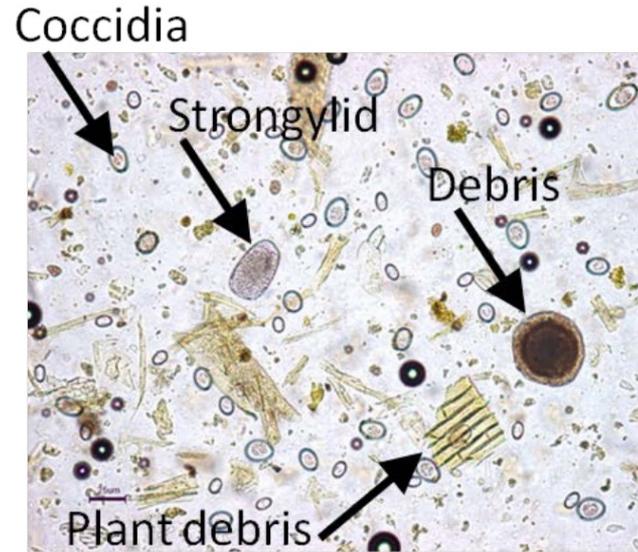
Errado!



Certo

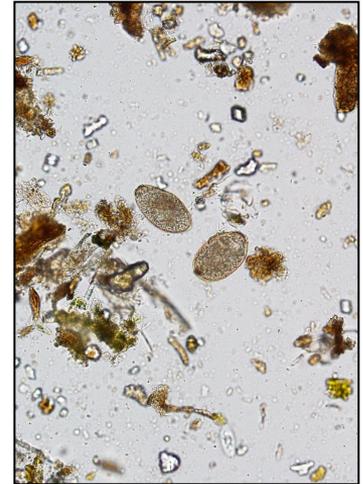


Inspecionar toda a área da lâmina



Exame direto a fresco - vantagens

- Rápido de preparar
- Se utilizado com solução salina, não causa distorções nos parasitas
- Permite visualizar trofozoítos de *Trichomonas* e *Giardia* (obrigatório o uso de solução salina)
- Útil para examinar fezes de pequenas aves e répteis (onde trematoides são comuns)
- Permite identificar quais parasitas são eliminados pelo hospedeiro



Exame direto a fresco - limitações

- Não pode ser usado para resultados quantitativos
- O método é relativamente insensível e depende do número de ovos da amostra ser alto
- A presença de muitos debrís pode tornar difícil a observação e identificação os ovos/cistos
- Areia, sementes e outros debrís fecais podem dificultar a deposição adequada da lamínula
- Pode requerer muito tempo para um exame adequado





Concentração por flutuação em sal
Técnica de Willis-Mollay

Concentração por flutuação em sal



Definição:

- Teste **qualitativo** para a detecção de ovos de nematóides e estágios de protozoários
- Conhecido como método de Willis
- Útil para ensaios preliminares visando identificar que grupos de parasitas estão presentes em uma amostra

Concentração por flutuação em sal



Princípio:

- Os ovos e/ou cistos são separados do material fecal e concentrados por uma solução de densidade maior do que a água
- Ovos “leves” (**pouco densos**) de helmintos e oocistos de protozoários, por terem densidade menor do que a do fluido de flutuação, tendem a subir e permanecer na superfície da solução

Por que boiamos no Mar Morto?



O Mar Morto é um lago salgado localizado em Israel, 411 m abaixo do nível do mar. Tem um índice de salinidade (200 g/kg) muito maior do que o oceanos (35 g/kg).

Solução salina saturada apresenta entre 26-28% de sal, dependendo da temperatura.

Devido à nossa diferença de densidade!



A densidade relativa (gravidade específica) é definida pela equação:

$$\rho = m / V$$

E pode ser expressa em kg/m^3

- $1 \text{ kg}/10^6 \text{ cm}^3 = 10^{-6} \text{ kg}/\text{cm}^3 = 1 \text{ g}/\text{cm}^3$

Algumas densidades:

- Água – $1.000 \text{ kg}/\text{m}^3$ (4°C - densidade máxima) = $1,000 \text{ g}/\text{cm}^3$
- Gelo – $916,7 \text{ kg}/\text{m}^3 = 0,917 \text{ g}/\text{cm}^3$
- Alumínio – $2.700 \text{ kg}/\text{m}^3 = 2,7 \text{ g}/\text{cm}^3$
- Ouro – $19.320 \text{ kg}/\text{m}^3 = 19,32 \text{ g}/\text{cm}^3$
- Corpo humano (densidade média) - $985 \text{ kg}/\text{m}^3 = 0,985 \text{ g}/\text{cm}^3$
 - Densidade da gordura – $0,9 \text{ g}/\text{cm}^3$ / Densidade sem gordura – $1,1 \text{ g}/\text{cm}^3$

$(1\text{m})^3 = (100\text{cm})^3$
 $1^3 \text{ m}^3 = 100^3 \text{ cm}^3$
 $1 \text{ m}^3 = 1,000,000 \text{ cm}^3$

É possível boiar na piscina porque nosso corpo é um pouco menos denso do que a água



Corpo humano: $0,985 \text{ g/cm}^3$

Água: $1,000 \text{ g/cm}^3$

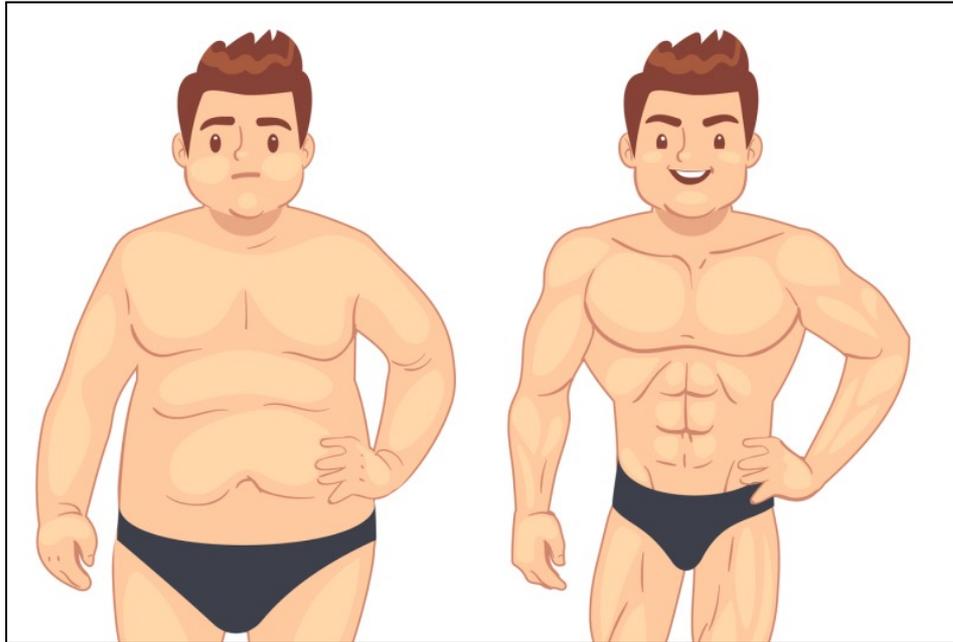
Mas no Mar Morto é muito mais fácil...



Corpo humano: $0,985 \text{ g/cm}^3$
Água do Mar Morto*: $1,240 \text{ g/cm}^3$
Água de oceanos*: $1,027 \text{ g/cm}^3$

*Valor médio na superfície

Não confundir peso e densidade!



Pesado e menos denso
Flutua **mais** facilmente

Leve e mais denso
Flutua **menos** facilmente

- Alguns livros de Parasitologia se referem a ovos “leves” e ovos “pesados”. **Eles estão conceitualmente errados!**
- Deveriam dizer ovos de alta e baixa densidade.

Gordura: $0,9 \text{ g/cm}^3$

Ossos e músculos: $1,1 \text{ g/cm}^3$

Concentração por flutuação



Soluções de flutuação:

- Solução saturada de sal (**NaCl**)
 - Gravidade específica: 1,18 - 1,20
 - Uso geral
 - Pode distorcer a morfologia, especialmente de trofozoítos de protozoários
- Solução saturada de açúcar (**sacarose**) – solução de Sheater
 - Gravidade específica – 1,20
 - Uso geral
 - Não afeta a viabilidade de ovos – recomendado para material para cultura

Concentração por flutuação



Soluções de flutuação:

- Solução de sulfato de zinco (ZnSO_4)
 - Gravidade específica: 1,18
 - Melhor solução para ovos de *Fasciola*
 - Reagente caro

Concentração por flutuação



Gravidade específica de alguns ovos de helmintos*

Espécie	Densidade média	Faixa
<i>Ancylostoma caninum</i>	1,0559	1,0549 – 1,0573
<i>Toxocara canis</i>	1,0900	1,0791 – 1,0910
<i>Toxocara cati</i>	1,1005	1,1004 – 1,1006
<i>Taenia</i> spp. (helminto cestóide)	1,2251	1,2244 – 1,2257
<i>Physaloptera</i> spp. (helminto nematóide)	1,2376	1,2372 – 1,2380
Solução de ZnSO ₄	1,18	-
Solução saturada de sal ou açúcar	1,20	-

* David and Lindquist, 1982. *J. Parasitology* 68: 916-919.

Concentração por flutuação em sal

Técnica de Willis-Mollay



Método:

- Colocar uma amostra de fezes em um recipiente
- Adicionar a solução de flutuação e com o auxílio de uma espátula homogeneizar



Concentração por flutuação em sal

Técnica de Willis-Mollay



Método:

- Após a homogeneização, transferir a suspensão de fezes para outro frasco coando o material através de uma peneira, coador ou gaze



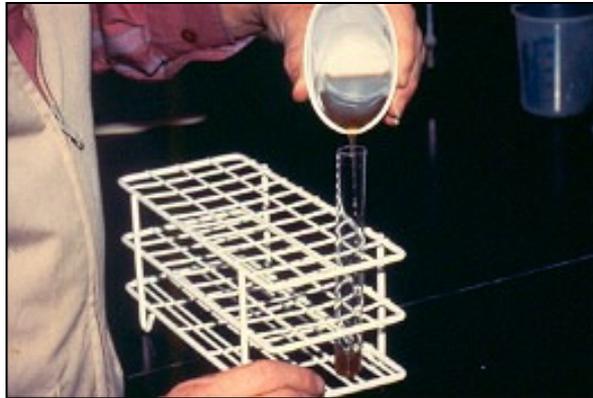
Concentração por flutuação em sal

Técnica de Willis-Mollay



Método:

- Transferir a suspensão para um tubo de ensaio e completar o volume com a solução de flutuação



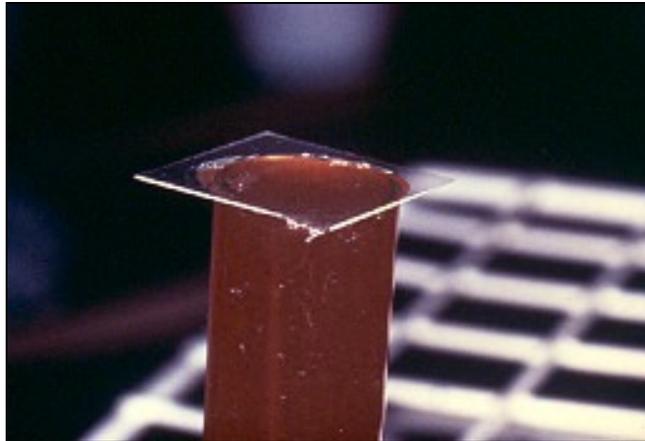
Concentração por flutuação em sal

Técnica de Willis-Mollay



Método:

- Depositar uma lamínula sobre o menisco do líquido.
- Aguardar cerca de 15 a 30 minutos para ocorrer a flutuação



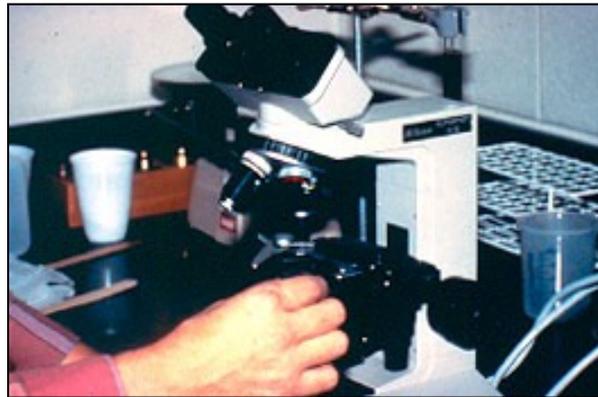
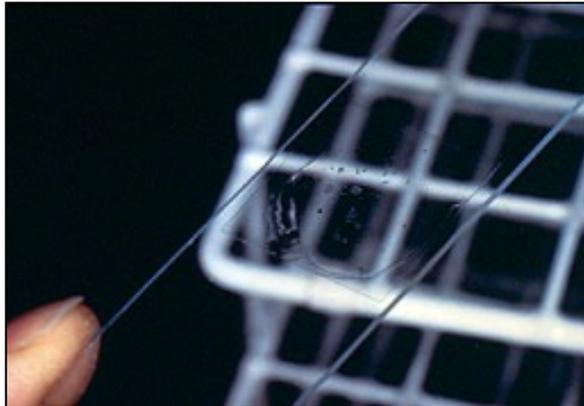
Concentração por flutuação em sal

Técnica de Willis-Mollay



Método:

- Retirar e inverter a lamínula com cuidado, depositando-a sobre uma lâmina de microscopia
- Observar a lâmina ao microscópio
- Pode-se adicionar lugol para melhorar a visualização



Flutuação em NaCl ou açúcar - vantagens



- Técnica flutua os ovos mais comuns de helmintos e oocistos de coccídias
- Soluções empregadas são baratas
- Há poucos debrís para dificultar a visão dos parasitas
- Concentra os parasitas em um volume pequeno
- Permite trabalhar com amostras maiores
- Aumenta a sensibilidade diagnóstica
- Pode ser muito acelerada utilizando-se centrifugação

Flutuação em NaCl ou açúcar - limitações



- A técnica não flutua ovos de trematóides e ovos de alguns vermes chatos (ordem Pseudophyllidea – Ex. *Diphyllobothrium*) – mais densos
- Distorce a morfologia de cistos de *Giardia*
- Pode ser demorada se não for feita com centrifugação
- Não aplicável em amostras de fezes contendo gordura
- Relativamente lenta – tempo de espera para os parasitas flutuarem → pode ser abreviada por centrifugação das amostras → técnica de centrífugo-flutuação

Flutuação em ZnSO_4 - vantagens



- Técnica recomendada para a maioria dos exames de fezes
- Flutua a maior parte dos ovos de helmintos
- Melhor método para cistos de protozoários, especialmente *Giardia* e para ovos de *Trichuris*. Na maioria dos caso recupera larvas de nematoides

Flutuação em ZnSO_4 - limitações



- Não flutua ovos de alguns trematóides e vermes chatos (ordem Pseudophyllidea – Ex. *Diphyllobothrium*)
- Não aplicável em amostras de fezes contendo gordura
- ZnSO_4 é caro e um hidrômetro deve ser usado para se fazer a solução (gravidade específica de 1,18)



Contagem de ovos

Técnica de McMaster

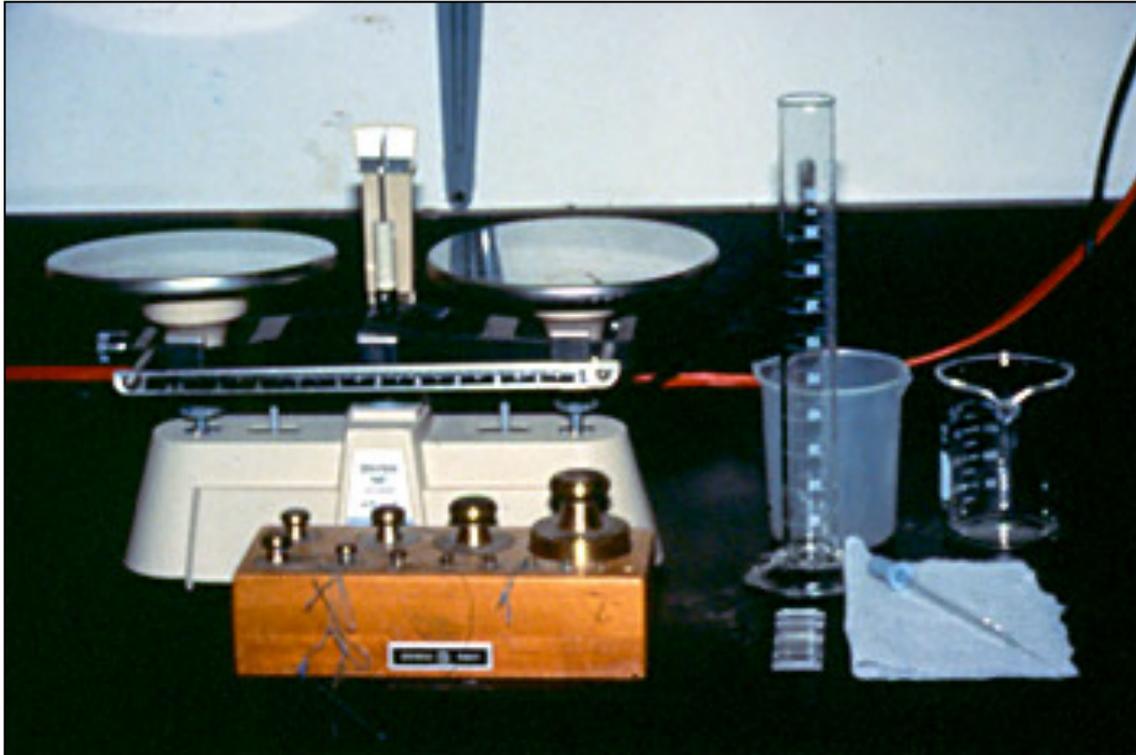
Contagem de ovos



Princípio:

- Método **quantitativo**
- Utiliza uma câmara de contagem (**câmara de McMaster**) que permite examinar microscopicamente um volume conhecido de suspensão fecal
- Utiliza uma solução de flutuação para que os ovos ou cistos permaneçam aderidos à superfície superior, facilitando a contagem

Material



- Balança
- Béquer
- Proveta
- Pipeta Pasteur
- Câmara de McMaster

Pesar as fezes



- Pesar 2 gramas de fezes

Transferir para um recipiente



Coletar solução salina saturada



- Utilizar 28 mL de solução

Adicionar a solução de flutuação



- Adicionar 28 mL de solução

Homogeneizar a suspensão



Filtrar a suspensão de fezes



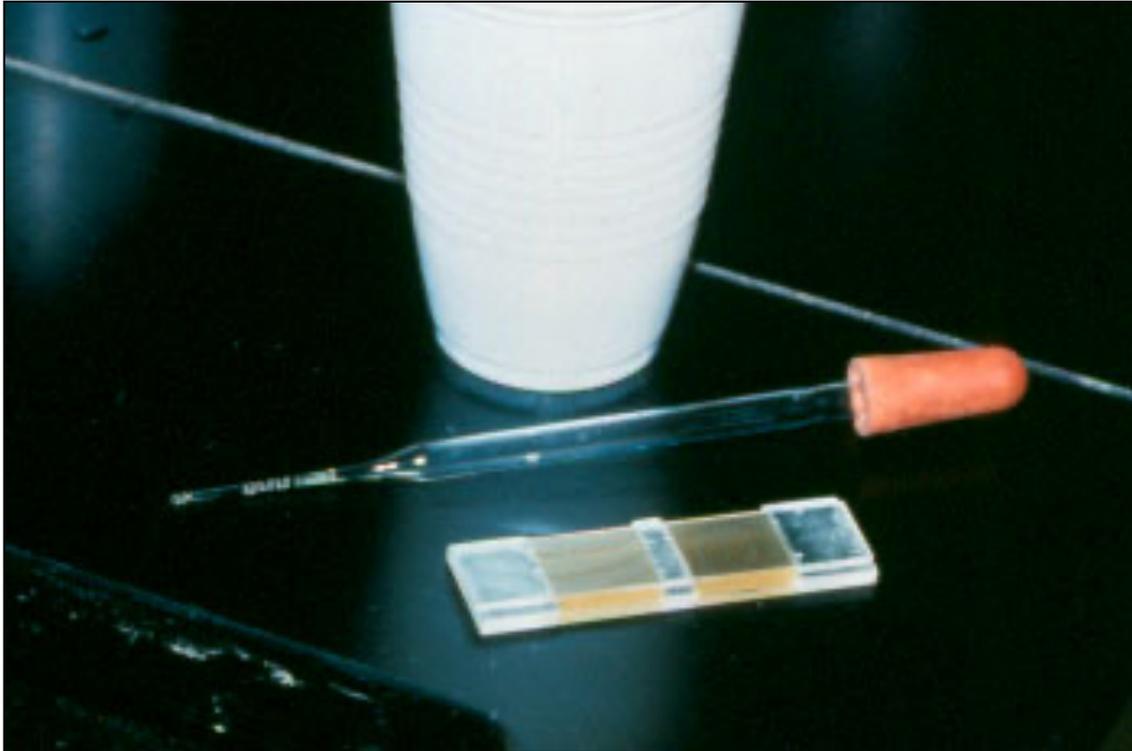
Colher uma amostra



Preencher a câmara de McMaster



Aguardar o processo de flutuação



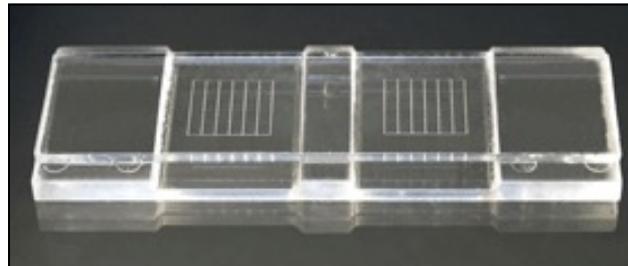
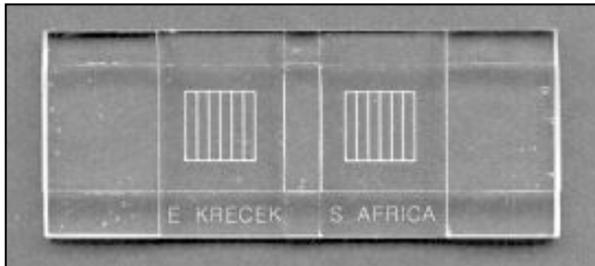
Examinar ao microscópio



Câmara de McMaster – contagem de ovos



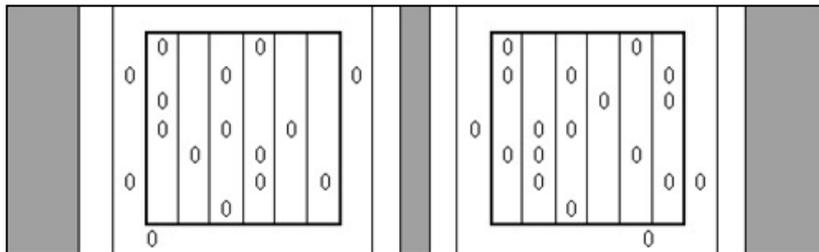
- Câmara para contagem de parasitas
- Possui dois compartimentos
- Cada compartimento possui uma retícula de 1,0 cm x 1,0 cm
- A altura do compartimento é de 0,15 cm
- O volume total de líquido em cada compartimento sob a retícula é de 0,15 cm³ (ml)



Calculando o valor de o.p.g.



O.P.G. - ovos por grama de fezes

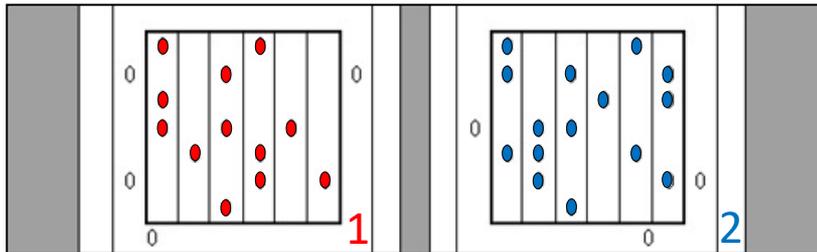


- Contar o número de ovos dentro de cada retícula quadrada
- Ignorar os ovos presentes nas áreas externas
- Usar 2 gramas de fezes para 28 ml de solução (total 30 ml)
- Cada compartimento possui 0,15 ml (total 0,3 ml)
- Multiplicar o valor total por 50
- O número resultante é o número de ovos por grama (o.p.g.) de fezes

Calculando o valor de o.p.g.



O.P.G. - ovos por grama de fezes



- **Contagem:** 12 ovos no compartimento 1 e 15 ovos no 2
- **Total de ovos na contagem:** $12 + 15 = 27$ ovos em 0,3 mL (2 x 0,15 mL por compartimento)
- **Amostra:** 2 g de fezes em 30 mL de volume total
- **Total de ovos na amostra:** 27×100 (0,3 mL é um centesimo do volume total da amostra) $\Rightarrow 2.700$
- **O.P.G:** Dividir o valor por 2 (a amostra tem 2 g) $\Rightarrow 1.350$ o.p.g.
- **Ou...** contar os ovos e dividir por 50 (multiplicar por 100 e dividir por 2)

Contagem de ovos - vantagens

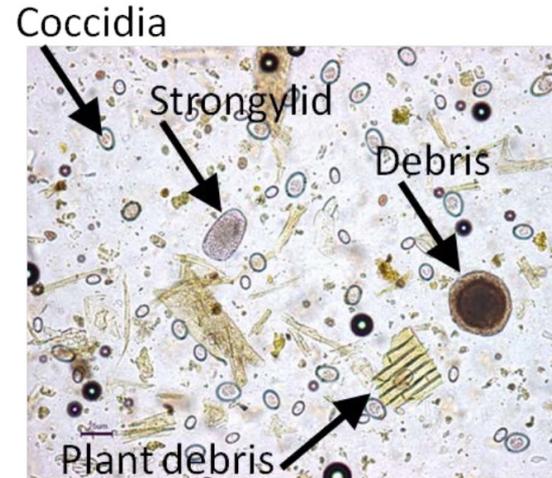


- Não requer nenhum equipamento especializado
- Permite quantificar o número de parasitas eliminados pelo hospedeiro

Contagem de ovos - limitações



- A contagem pode ser demorada, especialmente se houver grande quantidade de debris.
- Não aplicável em amostras de fezes contendo gordura
- Não flutua alguns tipos de ovos.





Algumas soluções utilizadas

Soluções - salina fisiológica

- 85 g de NaCl
- Completar com água destilada/deionizada para 1 L



Soluções - salina saturada



- Ferver 500 mL de água destilada/deionizada
- Mantendo a fervura, adicionar NaCl com agitação para dissolver
- Continuar adicionando NaCl sob agitação até não se conseguir mais dissolvê-lo
- Transferir a solução para um frasco e deixar resfriar.
- Um sedimento de NaCl deverá se formar no fundo
- A solução remanescente é saturada

Soluções - Iugol

- 2 g de iodo, 4 g de iodeto de potássio
- Completar com água destilada/deionizada para 100 mL





Obrigado pessoal. Até a próxima aula!