

1. Exame direto das fezes

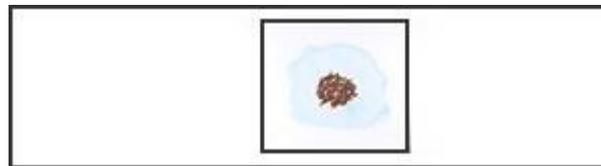
Material:

- Lâminas de microscopia
- Lamínulas
- Água ou solução salina (0,85%)
- Bastão de vidro ou palito
- Lugol (solução de iodo/iodeto de potássio) – usado como corante para permitir uma melhor visualização da estrutura interna dos ovos e oocistos.
- Microscópio

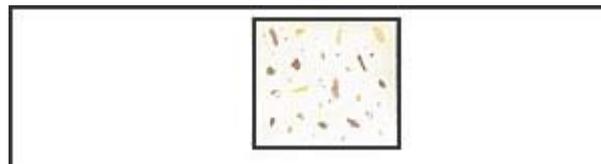
O exame direto é utilizado para demonstrar a presença de ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários.

1. Coloque uma pequena quantidade de fezes em uma lâmina de microscopia.
2. Coloque uma gota de líquido nas fezes e misture bem com uma espátula ou bastão. Se você estiver examinando trofozoítos (formas vivas e ativas) de protozoários, e necessitar diluir o material, utilize solução salina. Se estiver buscando ovos de helmintos ou então cistos de protozoários, então dilua o material em água ou lugol.
3. Cubra com uma lamínula. A suspensão deve ter espessura fina o suficiente para permitir a passagem da luz. Procure não deixar uma porção não misturada de fezes no centro. A suspensão deverá ser homogênea.

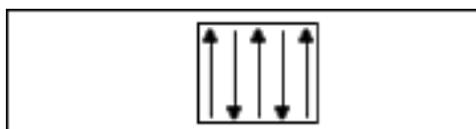
Errado!



Certo



4. Examine a lâmina com uma objetiva de 10x e, posteriormente, mude para a objetiva de 40X.
5. A inspeção da lâmina deverá ser feita escolhendo-se um canto e então movendo a lâmina para ao canto oposto, em um movimento de ida e volta, procurando sobrepor parcialmente os campos microscópicos.



Observação: Devido à pequena quantidade fezes examinada por esta técnica, ela somente é recomendada para os seguintes casos:

- a. Fezes líquidas que podem conter trofozoítos de protozoários.
- b. Amostras fecais cuja quantidade é pequena demais para permitir a realização de outras técnicas. Isso é particularmente frequente em amostras de animais silvestres como peixes, aves, répteis e anfíbios.

Vantagens da técnica

- Rápida de preparar.
- Se utilizada com solução salina, não causa distorções nos parasitas
- Única maneira de visualizar trofozoítos (obrigatório o uso de solução salina)
- Útil para examinar fezes de pequenas aves e répteis (onde trematóides são comuns)

Desvantagens da técnica

- Como somente se utiliza uma amostra muito pequena das fezes, os parasitas podem não ser detectados se a sua concentração for muito baixa ou se houver excesso de debrís ou gordura
- Areia, sementes e outros debrís fecais podem dificultar a deposição adequada da lamínula
- Pode requerer muito tempo para um exame adequado

Cuidados de segurança

Fezes podem conter patógenos perigosos (bactérias, vírus etc.). Procedimentos adequados de higiene e segurança devem ser empregados. Use avental e luvas durante a execução da técnica.

Bibliografia

- FAO Agriculture Department Animal Production and Health Division -
<http://www.fao.org/ag/againfo/resources/en/multimedia.html>.

- VETERINARY PARASITOLOGY VPTH603 LABORATORY -<http://cal.vet.upenn.edu/paraav/>

2. Concentração de oocistos, ovos de helmintos e cistos de protozoários por flutuação em sal

Material:

- Lâminas de microscopia
- Lamínulas
- Bastão de vidro ou palito
- Gaze ou coador de chá
- Tubo de ensaio ou recipiente de filme ou similar
- Provetas graduadas
- Béqueres ou recipientes similares
- Solução para flutuação
- Microscópio

Princípio

A técnica de flutuação é um teste qualitativo para a detecção de ovos de nematóides e oocistos de protozoários. É uma técnica útil para ensaios preliminares visando identificar que grupos de parasitas estão presentes em uma amostra. Contudo, ovos de muitas espécies de trematóides e cestóides, bem como cistos de *Giardia* não são detectados.

Os ovos e/ou cistos são separados do material fecal e concentrados por uma solução de flutuação em uma gravidade específica apropriada. Ovos leves, por terem densidade menor do que aquela do fluido de flutuação tendem a subir e permanecer no topo da coluna de líquido.

Os líquidos de flutuação utilizados são:

Solução saturada de sal (NaCl)

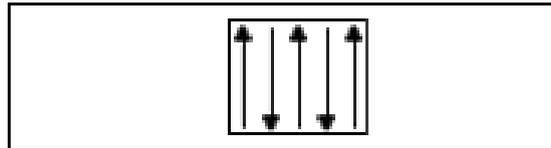
Solução saturada de açúcar (sacarose)

Solução de sulfato de zinco (ZnSO₄)

Método

1. Misture em um béquer uma pequena quantidade de fezes (cerca de 1 grama) com 50 ml de solução de flutuação e homogenize bem com um bastão de vidro ou palito.
2. Transfira a suspensão para um recipiente (caixa de filme, tubo de ensaio, etc.) filtrando-a com o auxílio de um funil com gaze ou, alternativamente, usando-se uma peneira de chá.
3. Adicione a suspensão até a mesma formar um menisco convexo na extremidade superior do recipiente.
4. Coloque uma lâmina por sobre a superfície convexa da suspensão.
5. Deixe por 15 minutos para que os ovos e oocistos possam flutuar.

6. Remova com cuidado a lâmina e coloque uma lamínula sobre lâmina de microscopia.
7. Observe a lâmina ao microscópio com uma objetiva de 10x e, posteriormente, mude para a objetiva de 40X.
8. A inspeção da lâmina deverá ser feita escolhendo-se um canto e então movendo a lâmina para ao canto oposto, em um movimento de ida e volta, procurando sobreopor parcialmente os campos microscópicos.



Gravidade específica de alguns ovos de helmintos, conforme determinada utilizando-se centrifugação em gradiente de densidade de sacarose*

Espécie	Gravidade Específica 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 spp.</i>	1,2251	1,2244 – 1,2257
<i>Physaloptera spp.</i>	1,2376	1,2372 – 1,2380
Solução de ZnSO₄	1,18	-
Solução saturada de sal ou açúcar	1,20	-

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

Flutuação em sal ou açúcar - Vantagens da técnica

- Técnica flutua os ovos mais comuns de helmintos e oocistos de coccídias
- Soluções empregadas são baratas
- Há poucos debris para dificultar a visão dos parasitas

Flutuação em sal ou açúcar - Desvantagens da técnica

- A técnica não flutua ovos de trematóides e ovos de alguns vermes chatos (ordem *Pseudophyllidea* – Ex. *Diphyllobothrium*)
- Distorce a morfologia de cistos de *Giardia*
- Pode ser demorada se não for feita com centrifugação
- Não aplicável em amostras de fezes contendo gordura

Flutuação em sulfato de zinco - Vantagens da técnica

- 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 casos recupera larvas de nematóides.

Flutuação em sulfato de zinco - Desvantagens da técnica

- 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)

Cuidados de segurança

Fezes podem conter patógenos perigosos (bactérias, vírus, etc.). Procedimentos adequados de higiene e segurança devem ser empregados. Use avental e luvas durante a execução da técnica.

Bibliografia

- FAO Agriculture Department Animal Production and Health Division - <http://www.fao.org/ag/againfo/resources/en/multimedia.html>.

- VETERINARY PARASITOLOGY VPTH603 LABORATORY - <http://cal.vet.upenn.edu/paraav/>

3. Contagem de oocistos, ovos de helmintos e cistos de protozoários nas fezes

Material:

- Balança
- Provetas graduadas
- Solução para flutuação
- Bastão de vidro ou palito
- Gaze ou peneira de chá
- Béqueres ou recipientes similares
- Pipetas Pasteur com peras de borracha
- Câmara de contagem de McMaster
- Microscópio

Princípio

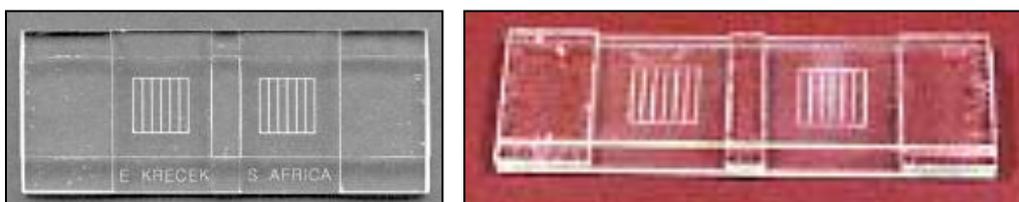
A técnica de McMaster é a mais usada para demonstrar a presença de ovos de helmintos e oocistos de coccídias em amostras de fezes.

O método utiliza uma câmara de contagem que permite examinar microscopicamente um volume conhecido (2 x 0,15 ml) de suspensão fecal. Um peso conhecido de fezes é misturado a um volume conhecido de solução de flutuação e o número de ovos (ou oocistos) por grama de fezes pode ser calculado. Esse valor é conhecido como o.p.g.

As quantidades de fezes e líquido são escolhidas de forma que a contagem de ovos possa ser facilmente derivada pela multiplicação do número de ovos sob a área delimitada por um simples fator de conversão.

A câmara de McMaster apresenta dois compartimentos, cada um com uma retícula gravada na sua superfície superior. Quando preenchida com a suspensão de fezes em solução de flutuação, a maior parte dos debrís se sedimenta no fundo, enquanto os ovos leves e oocistos flutuam, aderindo na superfície. Os parasitas presentes abaixo da retícula podem ser facilmente contados.

As contagens podem ser feitas antes e após um tratamento anti-helmíntico, permitindo monitorar a resistência a drogas. Contagens realizadas entre tratamentos permitem avaliar a carga parasitária e assim escolher a melhor estratégia de tratamento.



Método

1. Pesar 2 gramas de fezes.
2. Diluir com 28 ml de solução salina saturada ou com sulfato de zinco.
3. Homogeneizar bem a suspensão e transferir para um béquer ou recipiente similar passando-a através de peneira de chá ou em gaze dupla.
4. Ainda sob homogeneização, retirar uma alíquota com pipeta Pasteur e aplicar com cuidado em cada um dos compartimentos da câmara de McMaster.
5. Deixar a câmara em descanso por 5 minutos e examinar em microscópio. Primeiramente focar as linhas das retículas. Em seguida posicionar em um dos cantos de uma retícula e alterando ligeiramente o foco, focar os ovos/oocistos.
6. Cada área definida por uma retícula deverá ser inteiramente coberta e os parasitas detectados contados progressivamente.
7. Para o cálculo de o.p.g., multiplicar a soma dos ovos encontrados nos dois compartimentos por 50.

Explicação

Cada compartimento embaixo da retícula comporta um volume de 0,15 ml (a área riscada é de 1 cm por 1 cm, e a profundidade é de 0,15 cm, perfazendo um total de 0,15 cm³ ou 0,15 ml. Examinando-se os dois compartimentos, o volume total analisado será de 0,3 ml, que corresponde a 1/100 do volume total em que a amostra de fezes foi originalmente ressuspenso (2 gramas em 30 ml). Para o cálculo de ovos por grama, a multiplicação deve ser feita, portanto, por 50 (100 dividido por 2 gramas).

Vantagens da técnica

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

Desvantagens da técnica

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

Cuidados de segurança

Fezes podem conter patógenos perigosos (bactérias, vírus, etc.). Procedimentos adequados de higiene e segurança devem ser empregados. Use avental e luvas durante a execução da técnica.

Bibliografia

- FAO Agriculture Department Animal Production and Health Division - <http://www.fao.org/ag/againfo/resources/en/multimedia.html>.

- VETERINARY PARASITOLOGY VPTH603 LABORATORY - <http://cal.vet.upenn.edu/paraav/>