

Roteiro para aula prática de Técnicas Parasitológicas

1. Introdução

Exame de fezes ou exame coproparasitológico

Laboratório de coproparasitologia

- Riscos específicos no Laboratório de Parasitologia Clínica - Manipulação de Fezes
 - Ingestão de ovos de helmintos ou cistos de protozoários
 - Penetração cutânea de larvas
 - Contaminação com outros agentes infecciosos presentes
- Adoção de regras de biossegurança NB-2.
 - Utilização de avental e luvas de látex
 - Evitar comer, beber, fumar, utilizar cosméticos e manipular lentes de contato
 - Descontaminar a superfície de trabalho
 - *As precauções devem ser tomadas mesmo para manipulação de amostras em solução fixadora (ex. formalina)*

Fatores considerados na coleta:

- tipo de recipiente utilizado para colheita;
- idade da amostra;
- volume de material;
- utilização de medicamentos interferentes.

Coleta das fezes: recomendações

- As fezes, diarreicas ou não, devem ser recolhidas em recipiente limpo e seco, de boca larga e vedação hermética.
- A coleta deve ser realizada diretamente no frasco ou em papel limpo e transferida imediatamente para o frasco. A coleta não deve ser feita do vaso sanitário ou do solo.
- Quantidade ideal de amostra por frasco (coletor universal): 20 a 30 g.
- Colher 3 amostras em dias alternados (*Alguns parasitas apresentam intermitência na eliminação das formas parasitárias. Ex. Giardia lamblia*)
- Não contaminar com urina

➡ Não ingerir medicamentos antibióticos, antidiarreicos, hidróxido de magnésio, bário e óleo mineral. Se ocorrer, aguardar de 7 a 14 dias.

➡ Amostras com conservante ou fixador podem reunir fezes colhidas em dias alternados no mesmo frasco ou em frascos diferentes. A última coleta deve, preferencialmente, ser colhida em frasco sem conservante.

As amostras encaminhadas ao laboratório devem vir acompanhadas da requisição médica e devem trazer informações no frasco como: nome do paciente, número de identificação, idade, data e horário da colheita, nome do médico (opcional).

Preservação das amostras:

Refrigeração (3-5°C):

- preservação de ovos e cistos por vários dias
- larvas de *Strongyloides stercoralis* e de ancilostomídeos podem sofrer alterações morfológicas, assim como trofozoítas de protozoários.
- Formaldeído 5%
- MIF (mertiolato-iodo-formaldeído)
- SAF (acetato de sódio-ácido acético-formaldeído)
- APV (álcool polivinílico)
- Schaudinn
- Para oocistos de coccídeos: formaldeído 10% ou bicromato de potássio

Análise Macroscópica

São analisadas características como consistência, cor e odor.

➤ Escala de Bristol para classificação das fezes:

Tipo	Descrição	
1	Nódulos duros e separados	
2	Formato de linguiça com pequenas ondulações	
3	Semelhante a uma linguiça, porém com rupturas na superfície	
4	Liso, amolecido, semelhante a uma linguiça ou cobra	
5	Pedaços amolecidos; bordas bem definidas	
6	Pedaços de aspecto amolecido; bordas irregulares (aspecto pastoso)	
7	Apenas líquido; sem pedaços sólidos	

2. Atividade prática

2.1. Técnica de Hoffman, Pons e Janer ou Lutz

Princípio: Detecção de ovos pesados de helmintos

Fundamento: Sedimentação espontânea

Substância enriquecedora: Não possui

Utilização: inquéritos epidemiológicos, principalmente em áreas **esquistossomóticas**.

A técnica de Hoffman, Pons e Janer ou Lutz ou método de sedimentação espontânea consiste basicamente na mistura das fezes com água, sua filtração por uma gaze cirúrgica (ou parasitofiltro) e manutenção em repouso, formando uma consistente sedimentação dos restos fecais ao fundo do cálice. Uma alíquota do sedimento é pipetada sobre lâmina, é feito um esfregaço e observado em microscópio. Este método detecta a presença de ovos nas fezes, principalmente os pesados, após coloração com lugol. Diversas variações são realizadas nessa técnica a fim de promover a visualização de mais formas evolutivas, dada a praticidade da técnica. Após 24 horas de sedimentação, cistos de protozoários e larvas de helmintos também podem ser encontradas com maior facilidade. Essa é a técnica mais utilizada rotineiramente em laboratórios clínicos.

Materiais:

- Cálice de sedimentação
- Gaze
- Palito de madeira
- Frasco de borrel ou copos descartáveis
- Lâmina e lamínula
- pipetas pasteur
- Lugol

Técnica:

- 1) Tomar 2 a 4 gramas de fezes e desmanchar em frasco de borrel contendo água com auxílio de um bastão de vidro ou plástico;
- 2) Coar a emulsão por meio de gaze dobrada em 4 ou uma tela de plástico ou metal limpa, para dentro de um cálice de sedimentação cônico;
- 3) Completar o volume do cálice acrescentando mais água e misturando bem o conteúdo;
- 4) Deixar sedimentar por 2 horas;
- 5) Com uma pipeta Pasteur, retirar pequena amostra de sedimento do vértice do cálice, colocá-la sobre uma lâmina e cobrir com lamínula. Não é necessário corar os ovos, mas se houver interesse em reconhecer também os cistos de protozoários, juntar um pouco de lugol.

2.2. Técnica de Willis

Princípio: Detecção de ovos leves de helmintos

Fundamento: Flutuação

Substância enriquecedora: Solução saturada de Cloreto de sódio

A técnica de Willis baseia-se em duas características dos ovos a serem analisados. A primeira é a densidade, pois corpos menos densos tendem a flutuar sobre uma solução salina densa. Sendo assim, quanto menos densos os ovos, melhor sua separação por meio dessa técnica, que utiliza uma solução saturada de cloreto de sódio de densidade alta para induzir a flutuação dos ovos até a superfície.

Os ovos na superfície entrarão em contato com a face inferior de uma lâmina de vidro, devido a outra característica desses ovos, o tigmotropismo. Corpos com esta propriedade tendem a aderir a superfícies sólidas após um contato físico com elas. Juntando essas duas características a técnica de Willis permite fixar ovos pouco densos de uma amostra fecal em uma lâmina, por meio de sua flutuação sobre uma solução muito densa. Esses ovos são então observados microscopicamente.

É um método de grande eficiência, que por conta da purificação facilita a observação ao microscópio. Pode ser utilizado para observar qualquer estrutura pouco densa, podendo-se fazer modificações no método de forma a deixar a solução mais ou menos densa, para que ele se torne mais específico ou abrangente. Deve-se ter o cuidado ao escolher essa solução para que ela não prejudique os ovos que se deseja observar, alterando-os morfologicamente.

Materiais:

- Copos de café ou tampa de frasco de borrel
- Solução saturada de NaCl
- Palito de madeira
- Lâmina e lamínula
- Lugol

Técnica:

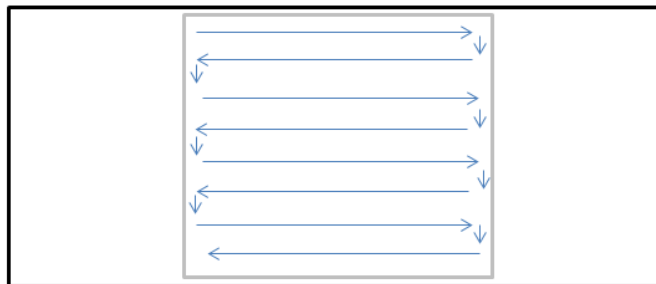
- 1- Colocar 10g de fezes na tampa do frasco de Borrel ou no próprio recipiente onde estão as fezes.
- 2- Homogeneíza-las com um pouco de solução saturada de sal (NaCl).
- 3- Completar o volume até a borda do frasco.
- 4- Colocar na boca do frasco uma lâmina, que deverá estar em contato com o líquido.
- 5- Deixar em repouso por 10 minutos.
- 6- Findo esse tempo, retirar rapidamente a lâmina, deixando a parte molhada voltada para cima.

7- Corar com Lugol, cobrir com lamínula e examinar com objetiva 10x.

2.3. Análise e identificação de parasitas em pool de fezes humanas

- 1- Pingar uma gota do sedimento do pool de fezes humanas na lâmina.
- 2- Acrescentar uma gota de lugol.
- 3- Homogeneizar com a lamínula
- 4- Ler no microscópio na objetiva de 10x e confirmar a morfologia dos parasito na de 40x.

Como ler a lâmina:



3. Relatório de aula prática

O relatório deverá ser elaborado a partir da observação dos parasitos encontrados nas técnicas de Hoffman e Willis e também no pool de fezes. No pool de fezes podem ser encontrados todos os helmintos de eliminação fecal estudados.

Em seu relatório você deve desenhar os parasitos encontrados e escrever:

- o nome das espécies observadas;
- a forma evolutiva;
- uma característica específica que confirma a espécie observada.

REFERÊNCIAS:

CHIEFFI, P. P. Parasitoses intestinais: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Lemos Editorial, 2001.

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.

REY, L. Bases da Parasitologia médica. Rio de Janeiro –2º ed. -: Guanabara-Koogan, -1992.

VERONESI, R. Doenças Infecciosas e Parasitárias – 7.ed.- Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1982.