

# Diagnóstico laboratorial dos parasitas sistêmicos

## Parte 1

***Profa. Dra. Irene Soares***

FCF/USP

2020

- Malária
- Doença de Chagas
- Toxoplasmose

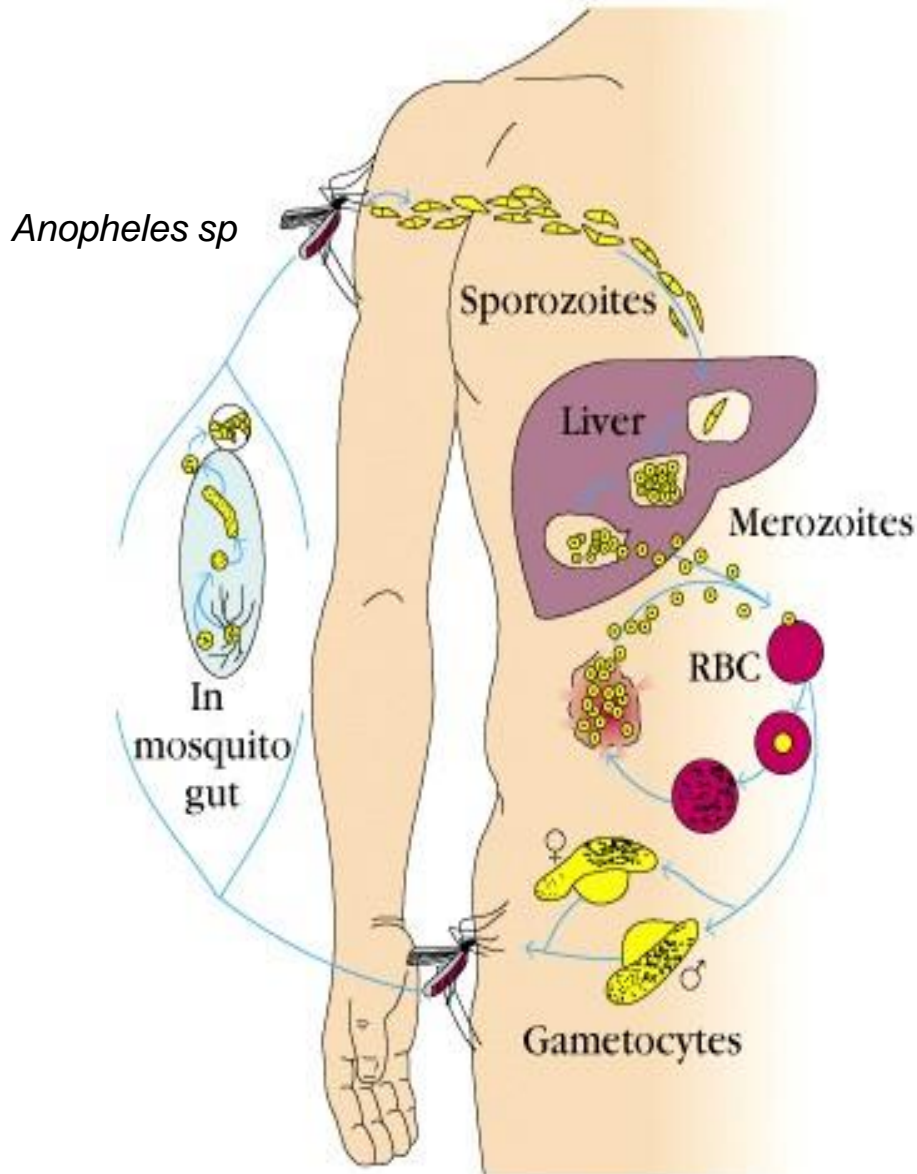
# Malária

## Etiologia:

- Gênero: *Plasmodium*
  - Espécies: > 100 espécies
  - No homem: *P. falciparum*  
*P. vivax*  
*P. malariae*  
*P. ovale*  
*P. knowlesi*
- } No Brasil

✓ O *P. vivax* é responsável por ~90% dos casos no Brasil

# Ciclo biológico



Esquizogonia  
tecidual ~ 15 dias  
(**assintomática**)

Esquizogonia  
sanguínea  
(**sintomática**)

# Manifestações Clínicas



**Calafrios**



**Febre**



**Sudorese**



**Anemia**

## Outros sintomas:

- Dor de cabeça
- Dores musculares
- Fadiga
- Náuseas e vômito

## Malária grave:

- Complicações renais
- Complicações respiratórias
- Complicações hematológicas
- Malária cerebral



**Convulsões**



**Coma**



WHO 2017

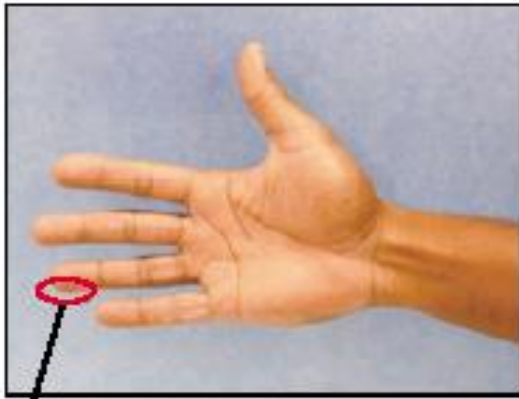
# Diagnóstico laboratorial

## Exame microscópico:

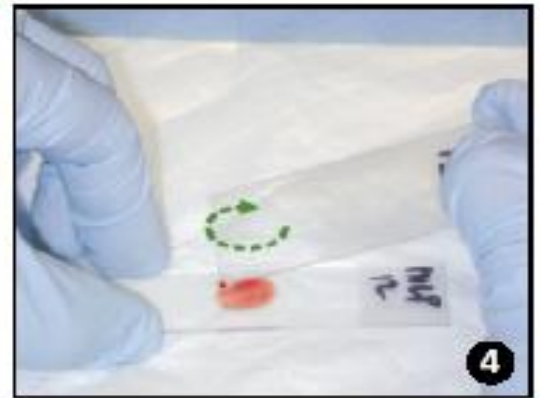
Pesquisa do parasita no sangue em preparações coradas

*Diagnóstico de espécie é extremamente importante para efeito de tratamento!*

# Coleta do Material



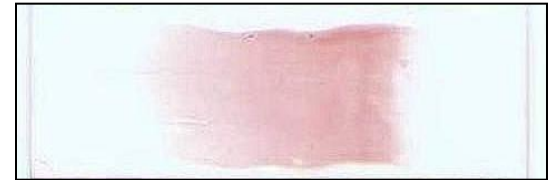
Punção digital



# Tipos de esfregaço

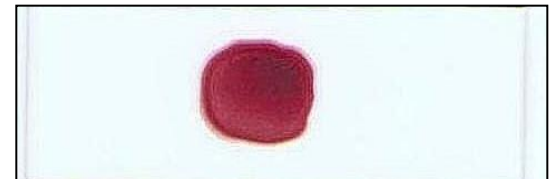
## ❑ Esfregaço Delgado:

- Visualização dos parasitas através de microscopia óptica após coloração com Giemsa
- Parasitos dentro dos eritrócitos
- Melhor identificação da morfologia
- Método auxiliar (**alta especificidade**)



## ❑ Gota Espessa:

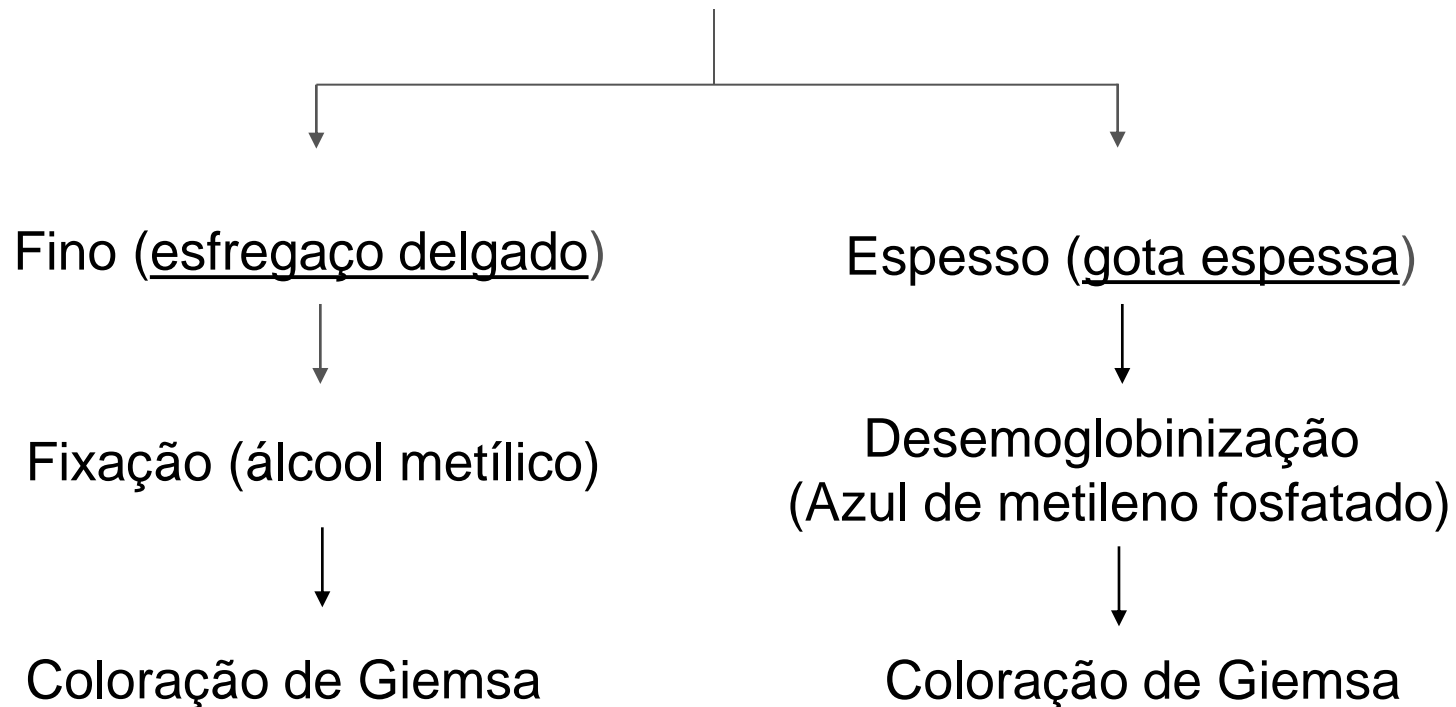
- Visualização dos parasitas através microscopia óptica após coloração com Azul de metileno fosfatado e Giemsa
- Parasitos fora dos eritrócitos
- Sensibilidade (20-30x mais alta)
- Simples, fácil execução, eficaz e baixo custo
- **Método de escolha (alta sensibilidade)**





# Diagnóstico microscópico:

## Preparo do esfregaço



# Coloração

1ª fase: Desemoglobinização → Azul de metileno



Enxague: água tamponada



2ª fase: coloração → Giemsa



10 minutos



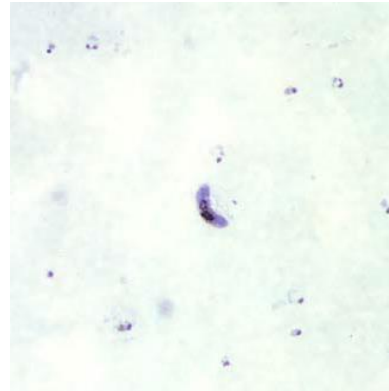
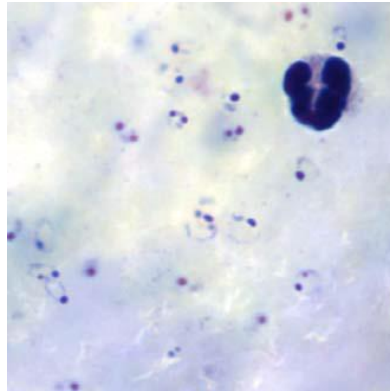
Enxague: água tamponada



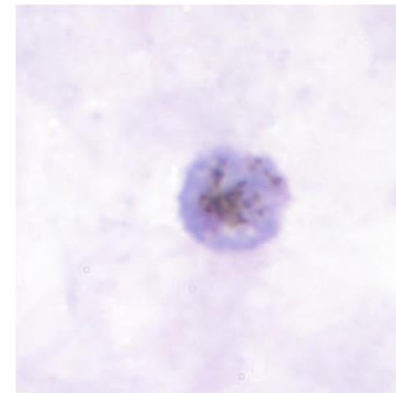
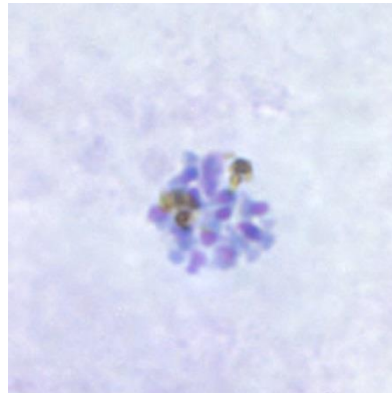
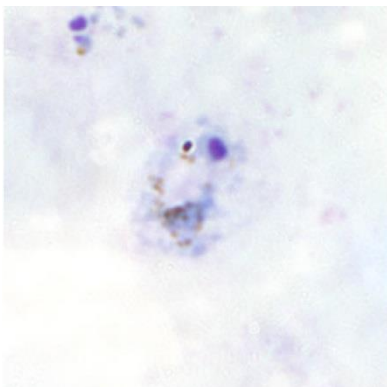
Secagem: TA e observação: 100X

# Características morfológicas dos parasitas em esfregaços sanguíneos espessos (gota espessa)

## *P. falciparum*



## *P. vivax*



# Gota espessa

Método semi-quantitativo:

- *Pv*: “Cruzes”;
  - Exame de 100 campos;
- *Pf*:
  - Avaliação Relativa;
  - 200 leucócitos.



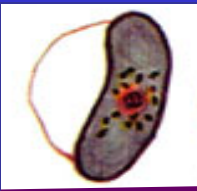






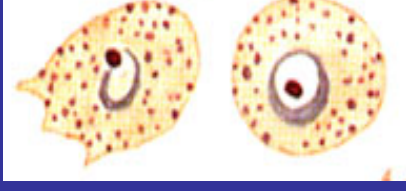
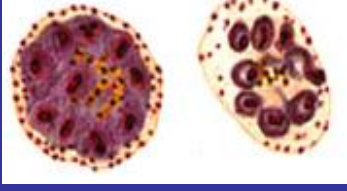

Parasitas por campo	Cruzes	Parasitas p/ mm <sup>3</sup>
40 a 60/100	+/2	200 - 300
1	+	301 - 500
2 - 20	++	501 - 10.000
21 - 200	+++	10.001 - 100.000
+ 200	++++	100.000 ou mais



Vantagem: concentra maior quantidade de sangue desmembrado em uma área relativamente pequena - aumenta a probabilidade de se encontrar parasitas

Desvantagem: requer experiência para a identificação de espécies, uma vez que a morfologia do parasita altera-se durante o processo de desmembramento.

## Formas sangüíneas (dentro das hemácias)

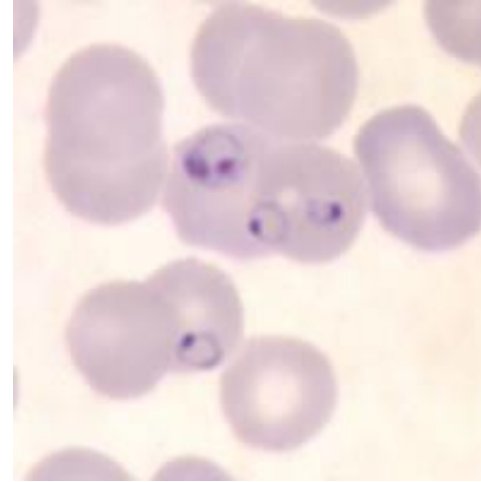
	Trofozoítas	Esquizontes	Gametócito
<i>P. falciparum</i>			
<i>P. vivax</i>			
<i>P. malariae</i>			
<i>P. ovale</i>			

✓ *P. vivax* e *P. ovale* infectam eritrócitos jovens (reticulócitos)

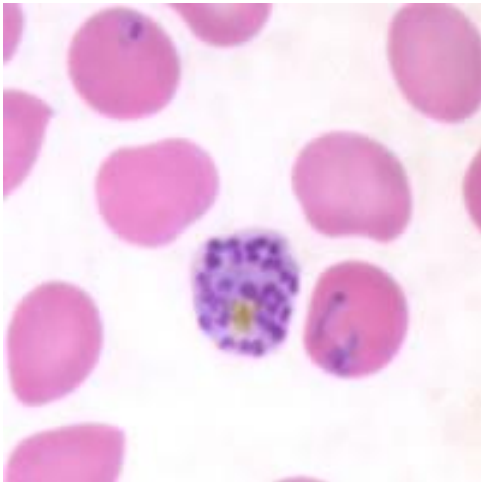
# *P. falciparum*



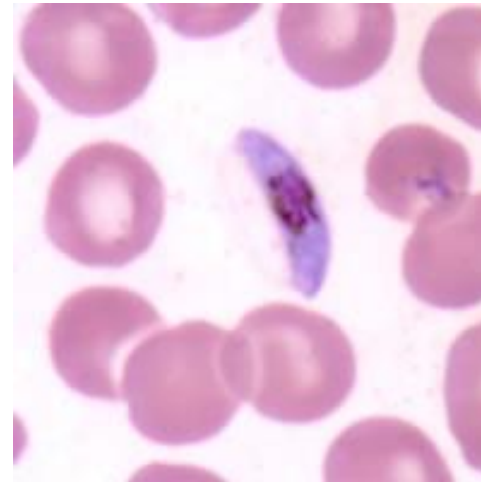
**Trofozoítas  
jovens**



**Trofozoítas  
maduros**  
(raros no sangue  
periférico)

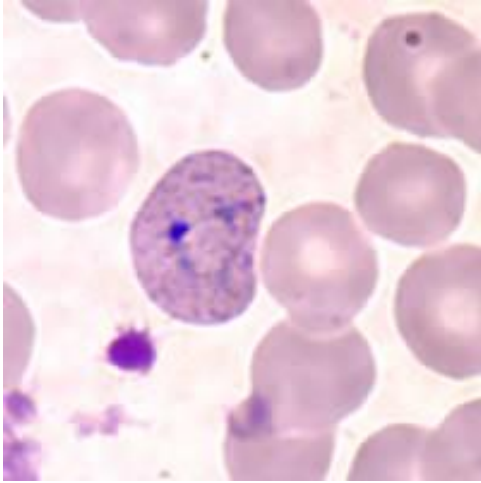


**Esquizontes**  
(raros no sangue  
periférico)

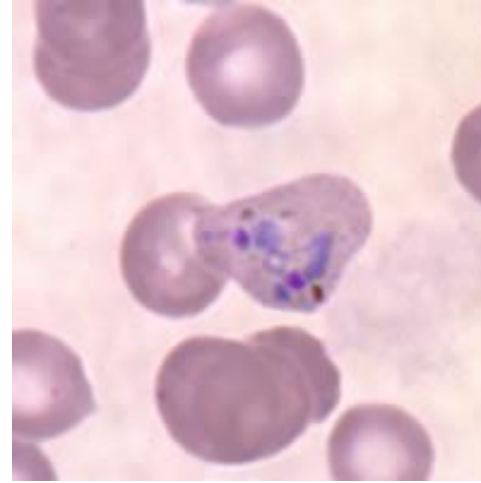


**Gametócitos**  
(aparecem na  
2ª semana da  
parasitemia)

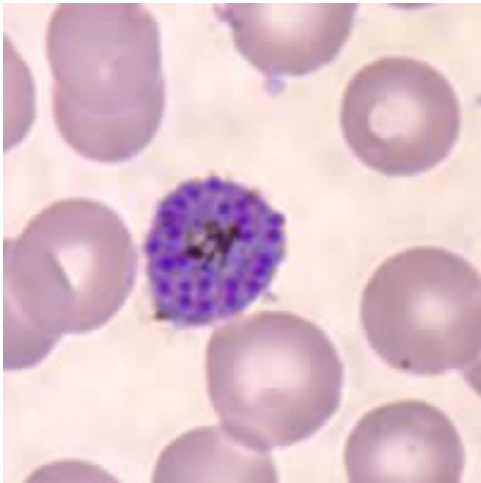
***P. vivax***



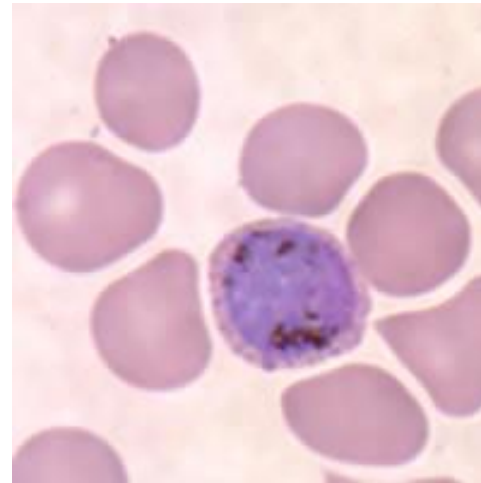
**Trofozoítas  
jovens**



**Trofozoítas  
maduros**



**Esquizontes**



**Gametócitos**  
**(aparecem  
precocemente)**

# Características morfológicas dos parasitas em esfregaços sanguíneos delgados

Estágio	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>
<b>Células vermelhas infectadas</b>	Tamanho normal, granulações de Maurer e <u>pigmento malárico</u>	<u>Aumentadas</u> , presença de <u>grânulos de Schuffner</u> (avermelhados)	Tamanho normal ou menores do que o normal	Aumentadas, podem ser ovais com fímbria, presença de grânulos de Schuffner
<b>Trofozoíta jovem</b>	Pequeno e delicado, <u>frequente 2 grânulos na cromatina</u> , <u>frequente 2 ou mais anéis por célula</u>	Pouco aumentado, 1 ou 2 grânulos na cromatina, podem ser 2 anéis por célula vermelha	Compacto, 2 anéis por célula vermelha do sangue, raro	Compacto, 2 anéis por célula vermelha do sangue, raro
<b>Trofozoíta maduro</b>	Tamanho moderado, normalmente compacto, pigmento granular	<u>Aumentado</u> , <u>amebóide</u> , pigmento visto em bastões finos	Pequeno, compacto, frequente, forma de banda, pigmento grosseiro	Pequeno, não amebóide, pigmento grosseiro
<b>Esquizonte</b>	<u>Raros em sangue periférico</u> , merozoítas pequenos (16-24)	Grandes, merozoítas grandes (12-24)	Pequenos, merozoítas grandes (6-12), pigmento grosseiro	Menores do que <i>P. vivax</i> , 6-12 merozoítas, pigmento mais escuro do que <i>P. vivax</i>
<b>Gametócitos</b>	Forma lua crescente ou <u>banana</u> , núcleo único	Esféricos, compactos, núcleo único, pigmento difuso e grosseiro	Similares a <i>P. vivax</i> , porém menores e menos numerosos, grânulos de Schuffner ausentes	Similares a <i>P. vivax</i> , porém menores



# Diagnóstico laboratorial

- **Testes rápidos de detecção de antígenos:** (imunocromatográficos):

Antígenos: HRP2 (Pf), LDH (Pf ou Pv/Pm/Po)

⇒ realizado em áreas de difícil acesso

⇒ não devem ser usados para controle de cura devido à possível persistência de partes do parasita

- **Testes para detecção de anticorpos:**

Imunofluorescência indireta

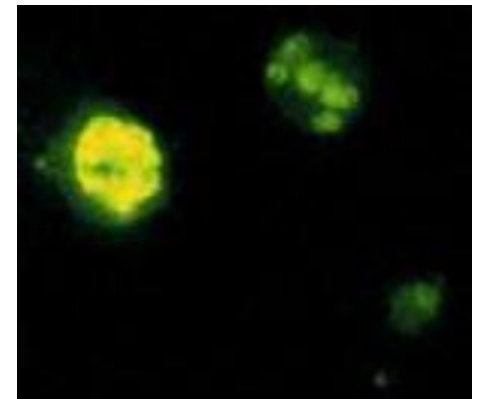
ELISA

⇒ permanece positivo após o tratamento

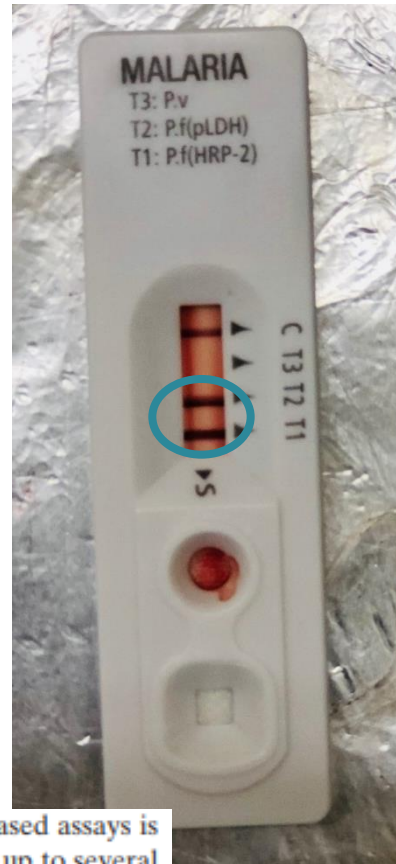
- **Nested PCR**

⇒ detecção de casos assintomáticos e infecções mistas (↑sensibilidade)

- ✓ *Dentre as espécies que infectam o homem, o Pf é a única que pode ser cultivada continuamente in vitro*



## Testes rápidos de detecção de antígenos:

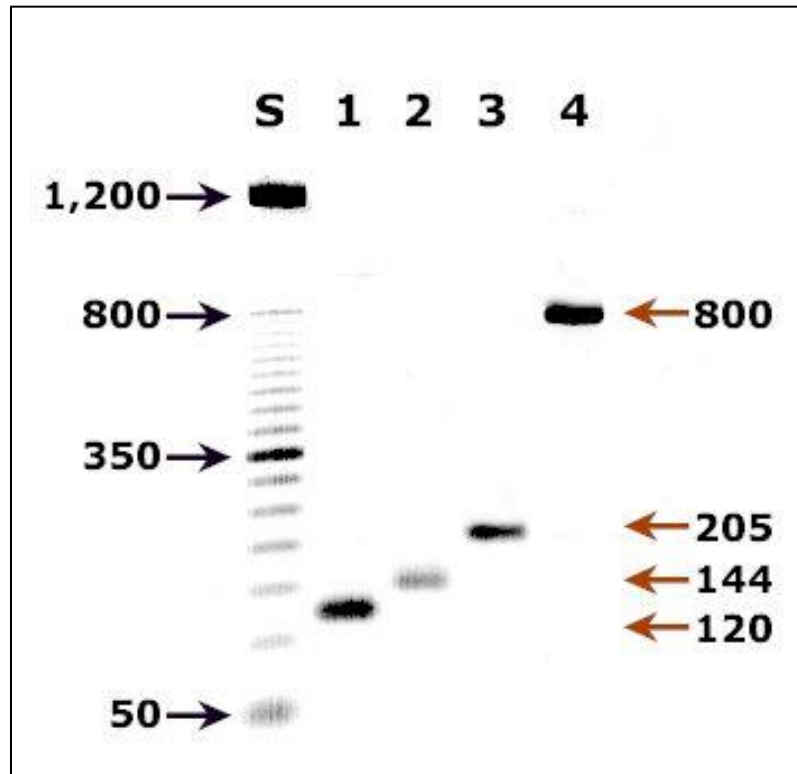


not available. A potential problem for HRP2-based assays is persistence of detectable circulating antigen for up to several weeks after parasites have been eradicated.<sup>10-12</sup> Persistent HRP2 antigenemia has not correlated with treatment failure, suggesting that this finding is not representative of persistent infection.<sup>10,12</sup> Persistent antigenemia thus may limit the usefulness of HRP2-based assays in areas of intense malaria transmission, where positive tests may commonly be due to

### Performance

- Sensitivity: Pf(HRP2)-99.7%, Pf(pLDH)-97.4%, Pv-95.5%
- Specificity: 99.3%

# Diagnóstico por PCR



- **Lane S:** Molecular base pair standard (50-bp ladder). Black arrows show the size of standard bands.
- **Lane 1:** The red arrow shows the diagnostic band for *P. vivax* (size: 120 bp)
- **Lane 2:** The red arrow shows the diagnostic band for *P. malariae* (size: 144 bp)
- **Lane 3:** The red arrow shows the diagnostic band for *P. falciparum* (size: 205 bp)
- **Lane 4:** The red arrow shows the diagnostic band for *P. ovale* (size: 800 bp)

# Aula Prática

Identificação de *P. vivax* e *P. falciparum*  
em preparações coradas

***P. vivax***

***P. falciparum***

**Todas as formas:**

Trozoítas (anel)  
Esquizontes  
Gametócitos

Trozoítas (anel)  
Gametócitos

# Doença de Chagas

## Etiologia:

*Trypanosoma cruzi* → Tripanossomíase americana

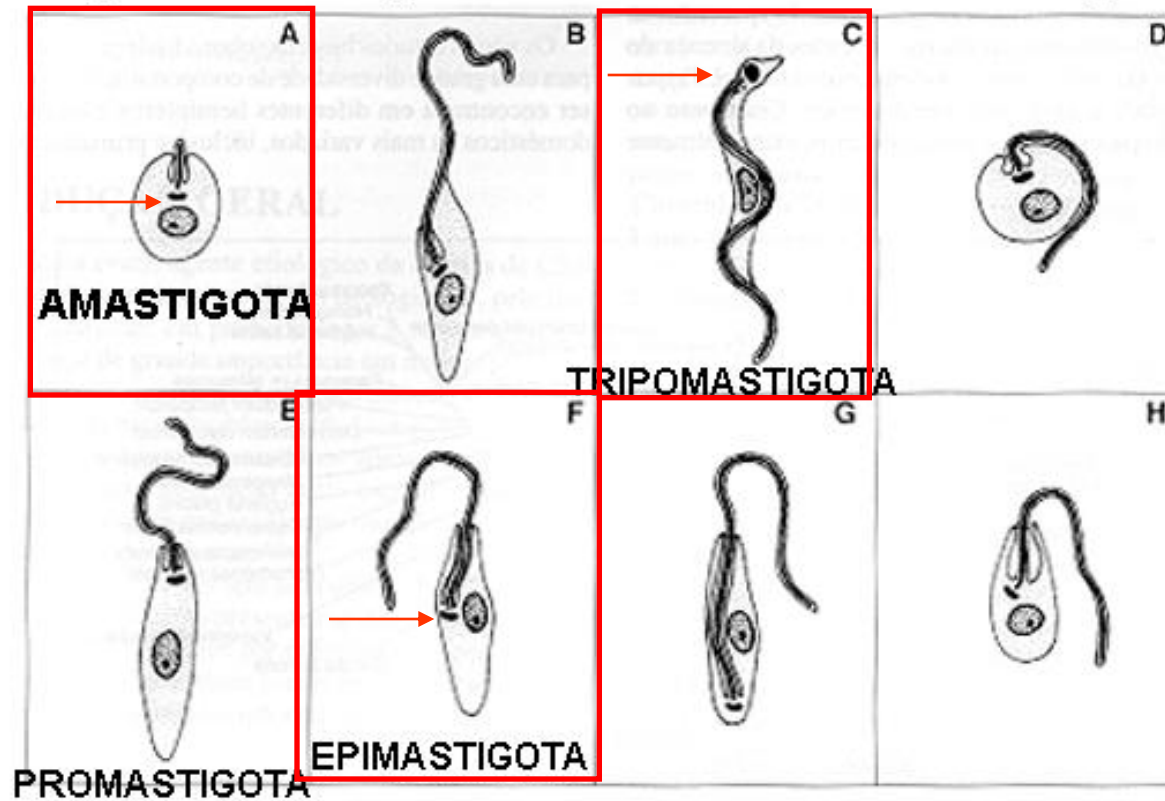
## Outras espécies de *Trypanosoma*:

*T. brucei* → Doença do Sono (África)

*T. rangeli* → Não patogênico (Américas)

# Estágios evolutivos do parasita

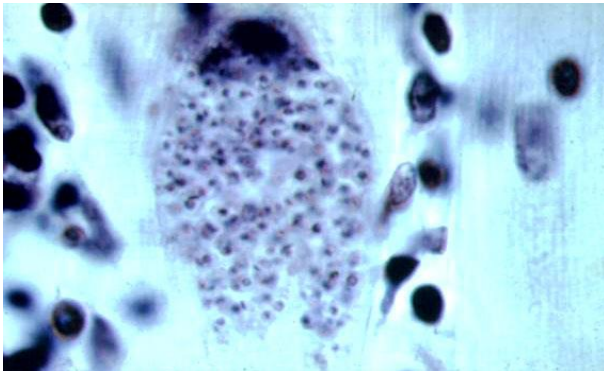
## Morfologia dos flagelados da ordem Kinetoplastida



# Biologia do parasita (formas evolutivas)

## Amastigota:

(no hospedeiro vertebrado, em cultura de células e animais de laboratório)



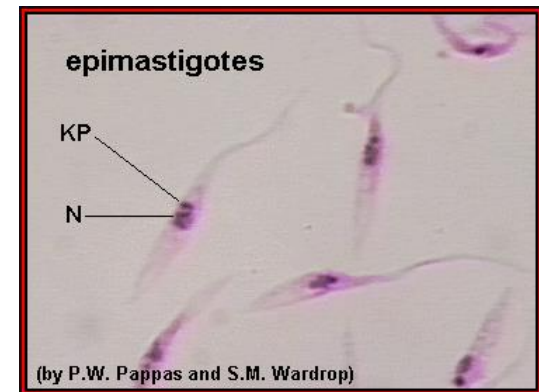
## Tripomastigota:

(no hospedeiro vertebrado, em cultura de células e animais de laboratório)

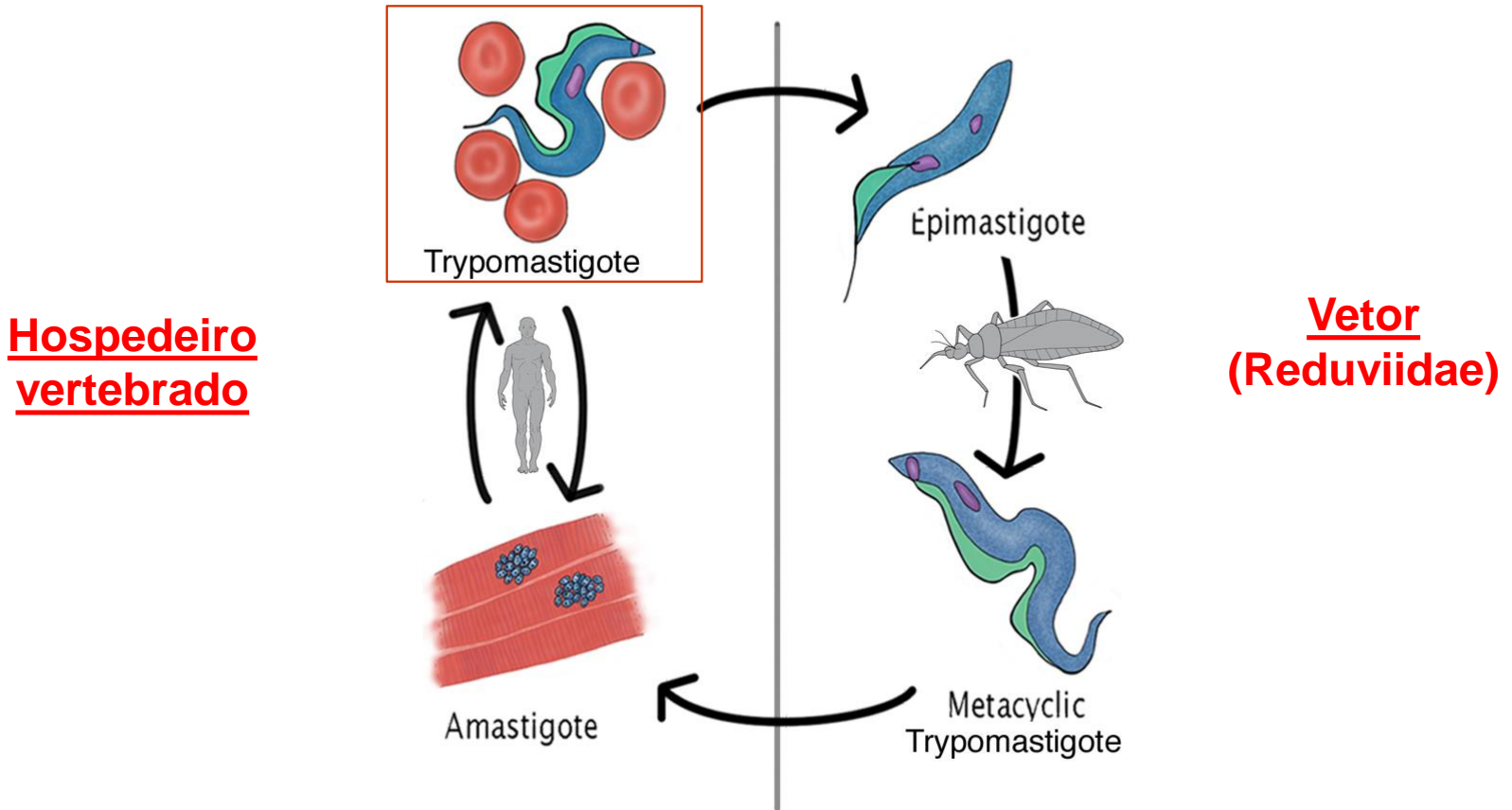


## Epimastigota

(no inseto vetor – “barbeiro”  
e em cultura axênica)

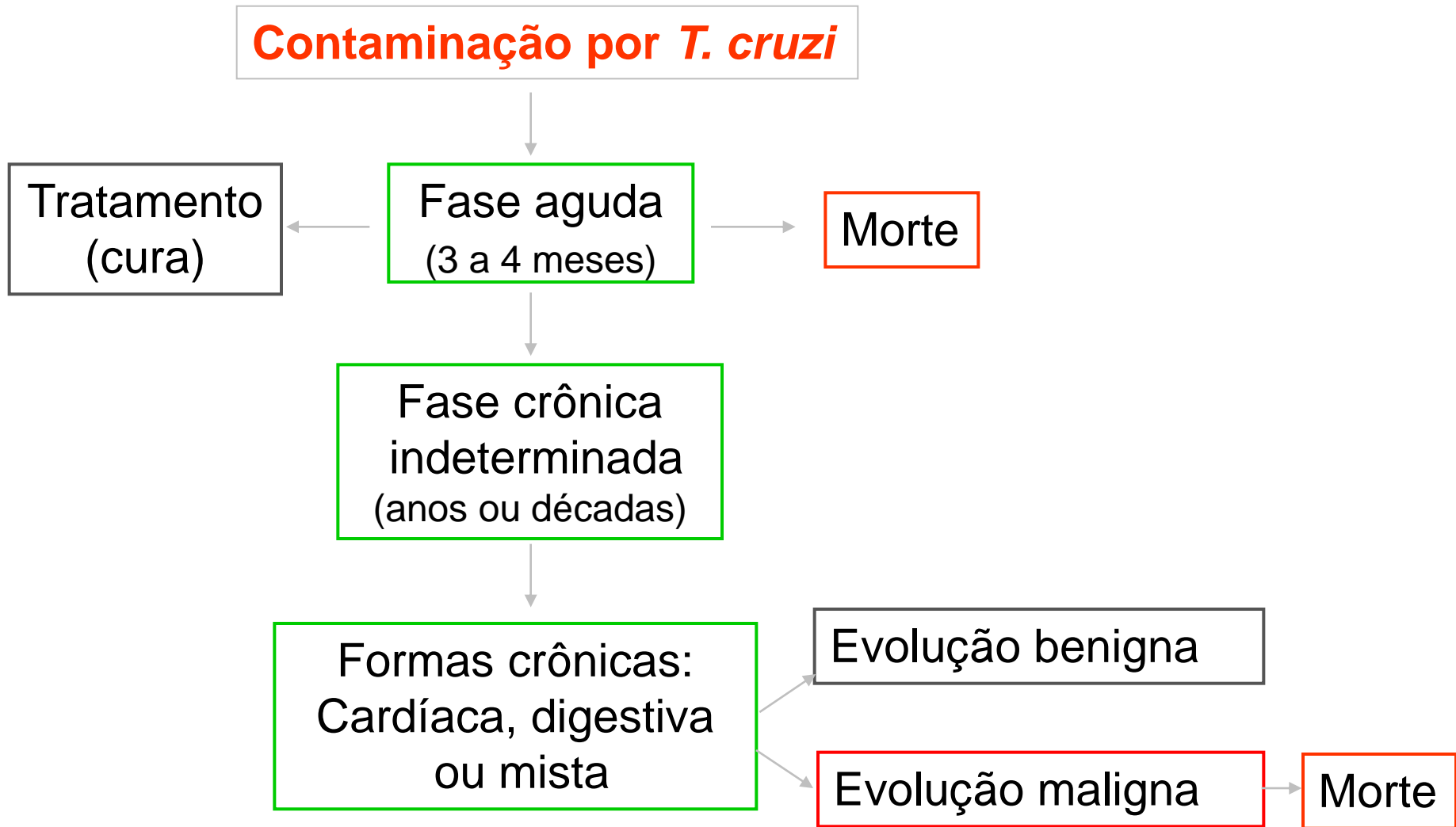


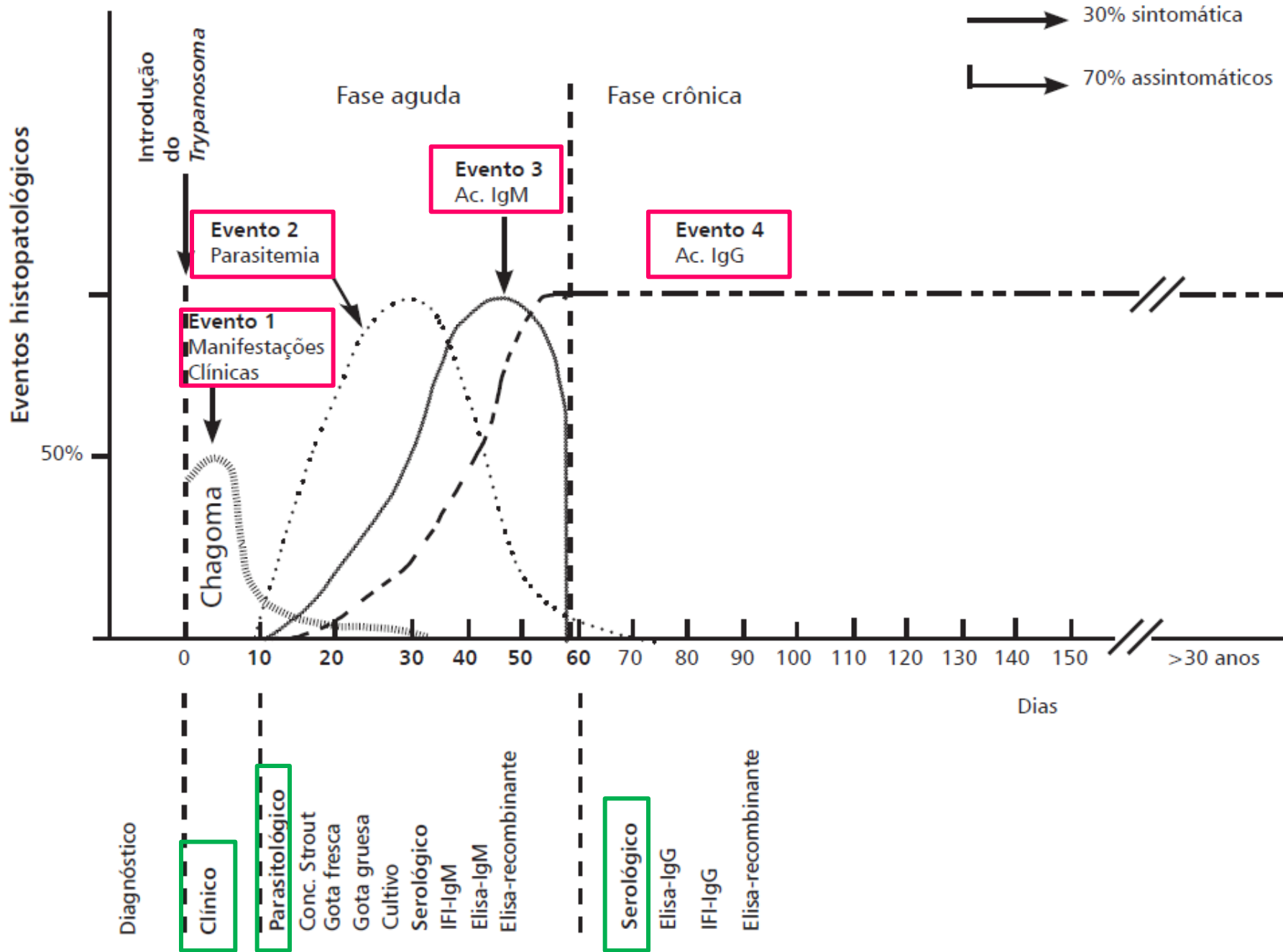
# Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*



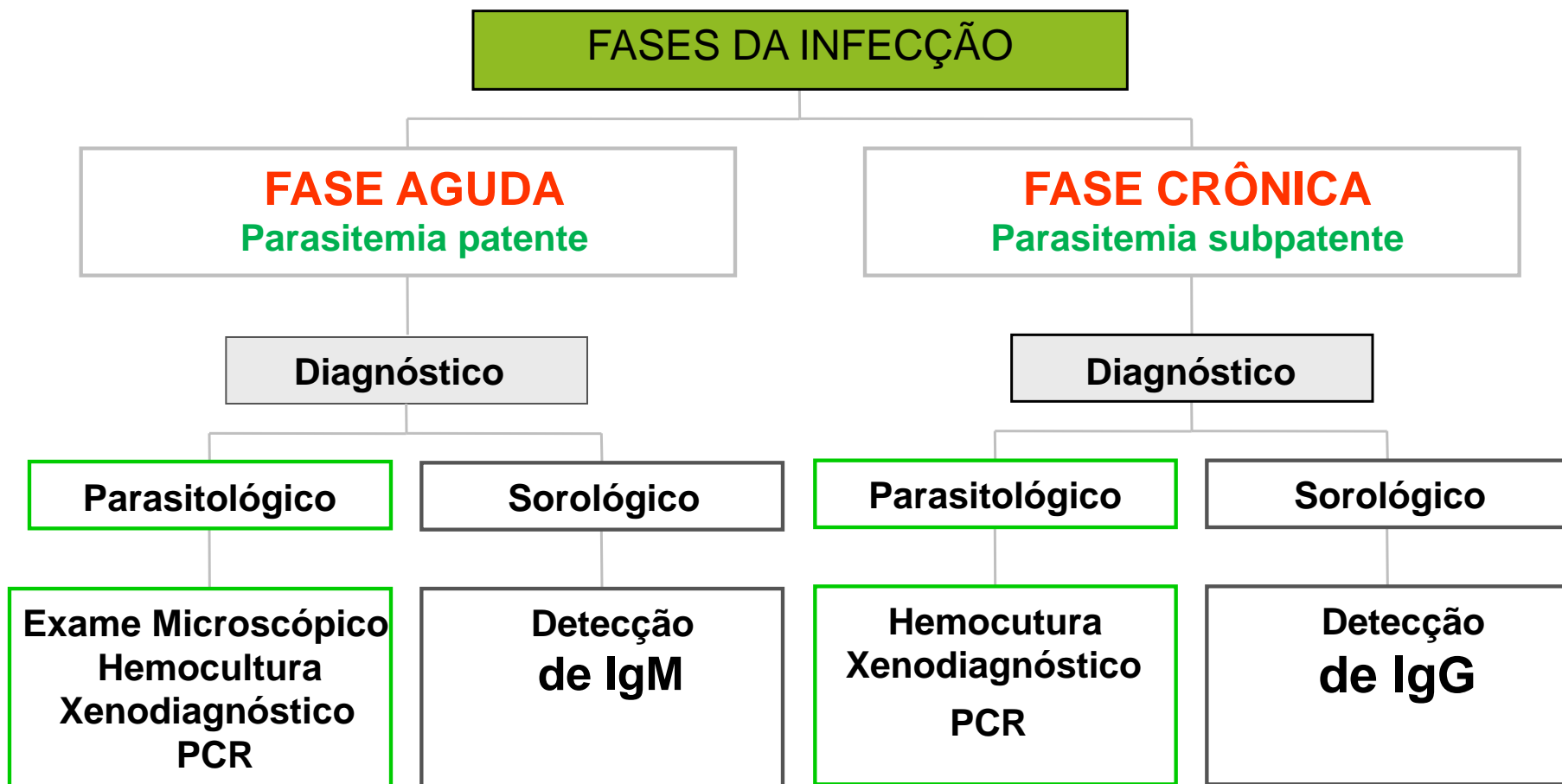


# Desenvolvimento da Doença de Chagas no homem





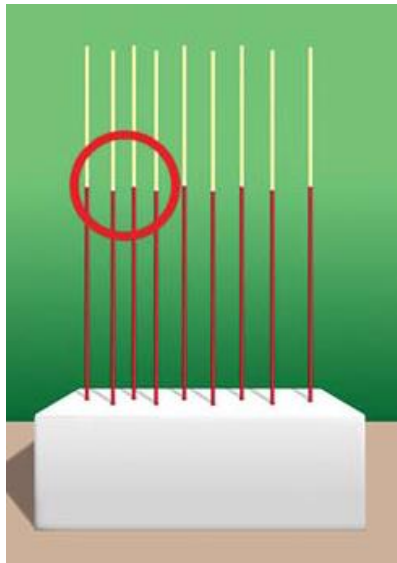
# Diagnóstico laboratorial



# Diagnóstico parasitológico

## ● Microscopia → detecção de tripomastigotas no sangue:

- Exame a fresco em lâmina (+ sensível)
- Gota espessa ou esfregaço corado com Giemsa ou Leishman
- Centrifugação em tubos capilares (micro-hematócrito):
  - ↑ sensibilidade (80 a 90%)



A fresco (lupa entomológica)

Corado



# Diagnóstico parasitológico

- **Xenodiagnóstico:**

Consiste na alimentação de ninfas de triatomíneos não infectados (criados em laboratório) com o sangue de pacientes – 5 a 10 ninfas mantidas em jejum por 3 a 4 semanas.



Natural (Émile Brumpt, 1914)

**Em desuso**



Artificial



30, 60 e 120 dias

Exame  
das  
Fezes

# Diagnóstico parasitológico

- **Hemocultura:**

Cultura do sangue em meio LIT (*liver infusion tryptose*) – 28°C

Leitura: 30, 45, 60, 90 e 120 dias → exame a fresco ou com coloração vital (azul de metileno)

# Diagnóstico parasitológico

MÉTODO	SENSIBILIDADE (Fase Aguda)	SENSIBILIDADE (Fase Crônica)
<b>Microscopia</b>	50 - 90%	↓
<b>Xenodiagnóstico</b>	85 - 100%	~ 50%
<b>Hemocultura</b>	100%	~ 50%

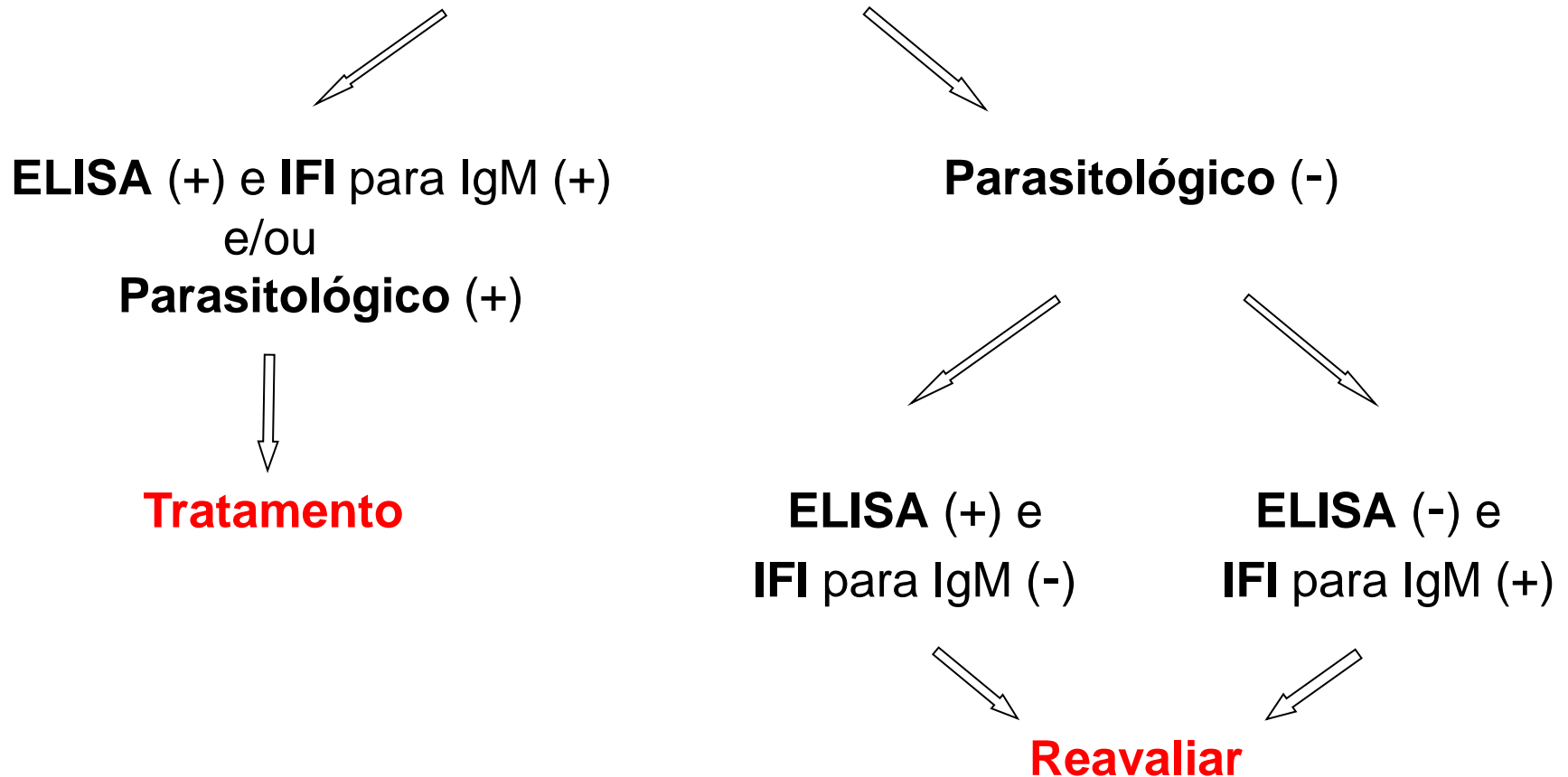
# Diagnóstico sorológico (Sorologia convencional)

- **Métodos:** Hemaglutinação indireta (HAI)  
Imunofluorescência indireta (IFI)  
Ensaio imunoenzimático (ELISA)
- **Antígenos de *T. cruzi*:** Extratos totais  
Frações semi-purificadas  
(epimastigotas)



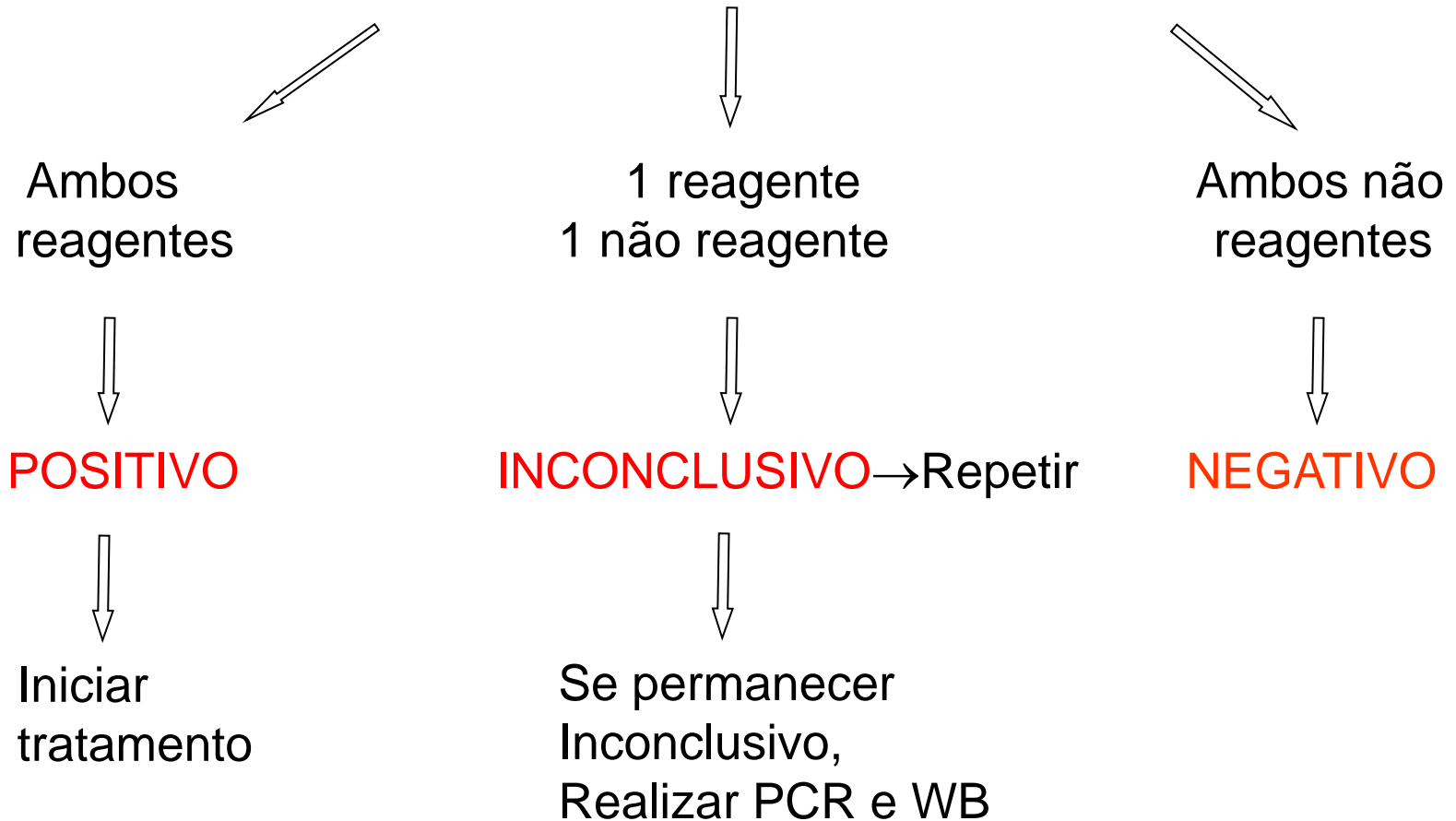
# Conduitas para o Diagnóstico Laboratorial de Doença de Chagas Aguda (DCA)

Realizar: Sorologia para **IgM** (ELISA e IFI) e Parasitológico



# Conduitas para o Diagnóstico Laboratorial de Doença de Chagas Crônica

Realizar 2 testes sorológicos (IgG): **ELISA, IFI ou HAI**



## Outros métodos disponíveis

- Western blot (WB) utilizando antígenos nativos: antígenos de excreção-secreção (tripomastigotas)
- ELISA utilizando antígenos recombinantes  
(↑ especificidade)
- PCR: para o controle da parasitemia pós-tratamento

# Caso confirmado de Doença de Chagas Congênita

**Recém-nascido de mãe com exame parasitológico ou sorológico positivo para *T. cruzi* e que apresente:**

- Exame parasitológico positivo a partir do nascimento  
Material: sangue do cordão umbilical, sangue periférico

***Ou***

- Exame sorológico positivo a partir do 6<sup>o</sup> mês de nascimento e sem evidência de infecção por outras formas de transmissão.

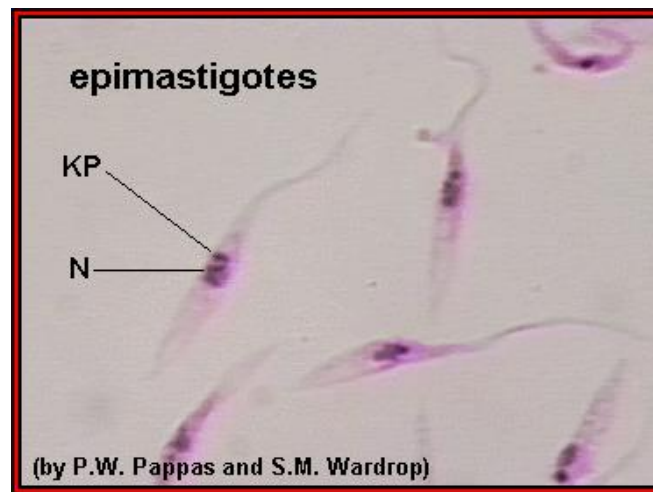
# Aula Prática

Identificação de *Trypanosoma cruzi* em  
preparações coradas

## Tripomastigota



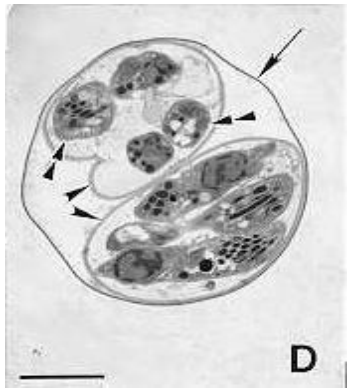
## Epimastigota



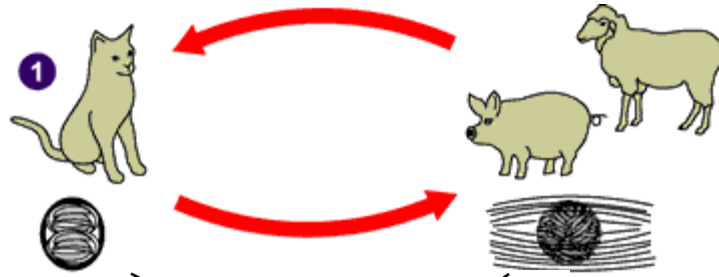
# Toxoplasmose

**Agente etiológico: *Toxoplasma gondii***

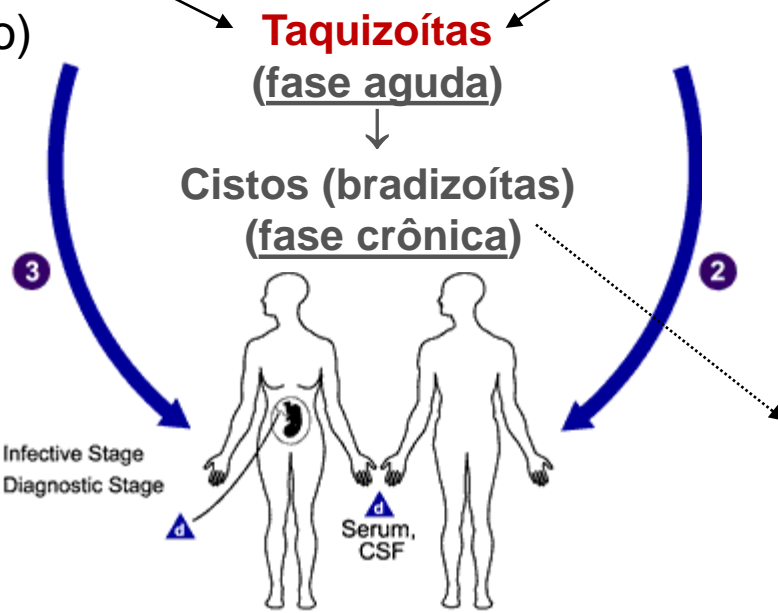
# Ciclo biológico do *T. gondii*



Oocistos esporulados (fezes de gato)

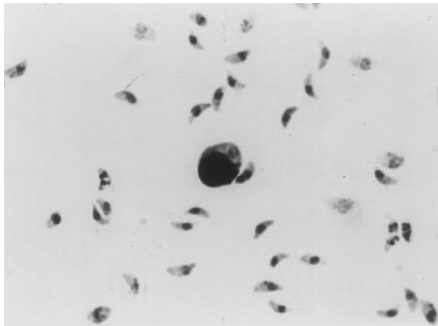


Cistos contendo bradizoítas (carne crua ou mal cozida: porco, carneiro)



Células epiteliais, musculares e nervosas

**Transmissão placentária de taquizoítas**



# Manifestações Clínicas

## **Infecções primárias adquiridas após o nascimento:**

- Em imunocompetentes:
  - Assintomáticos (90%)
  - Quadro autolimitado de linfadenopatia febril (<1%)
  - » Infecções crônicas: o parasita persiste sob a forma de cisto
- Em imunocomprometidos: as manifestações incluem sinais de comprometimento dos pulmões, dos olhos, do coração e, sobretudo, do cérebro. Pode ocorrer reativação de infecções crônicas latentes (cérebro, olho)

**Infecções congênitas:** Quadros clínicos de diferentes gravidades



# Diagnóstico Laboratorial da Toxoplasmose Adquirida

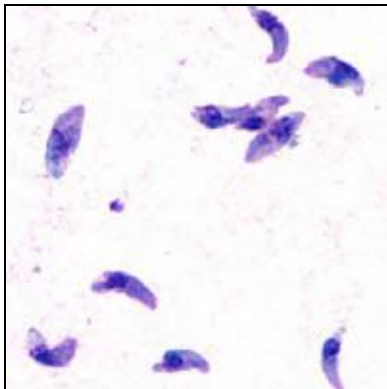
## Diagnóstico Parasitológico

- Isolamento do parasita por inoculação de amostras clínicas em camundongos: 6 a 10 dias → pesquisa de taquizoítas no líquido peritoneal ou cistos no cérebro ou outros órgãos

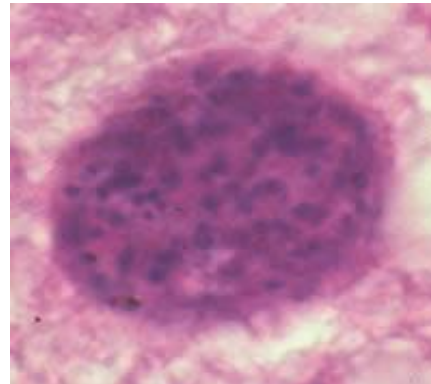
Material: sangue, humor aquoso, homogenatos de placenta, LCR

### » Limitações:

- resultados demorados
- riscos para o manipulador
- custo



Taquizoítas coletados de líquido peritoneal de camundongo inoculado com *T. gondii* (Giemsa)



Cisto contendo bradizoítas (tecido cerebral, HE)

## Diagnóstico Parasitológico

- Semeadura do material em cultura de células (fibroblastos) → IFI

Material: sangue, LCR, líquido amniótico

» Limitações:

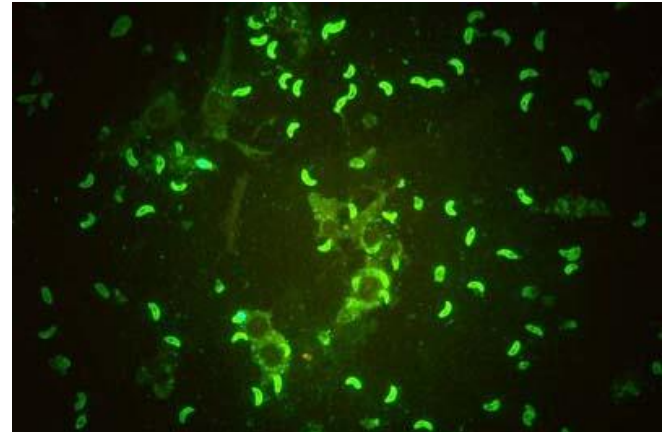
- resultados demorados
- custo elevado

- Histopatológico: pesquisa de taquizoítas e cistos em tecidos



# Diagnóstico Sorológico

- Hemaglutinação indireta: para “screening”
- Imunofluorescência indireta →
  - IgM - fase aguda (pico 6-8 sem)
  - IgG - fase crônica (pico 12 sem)



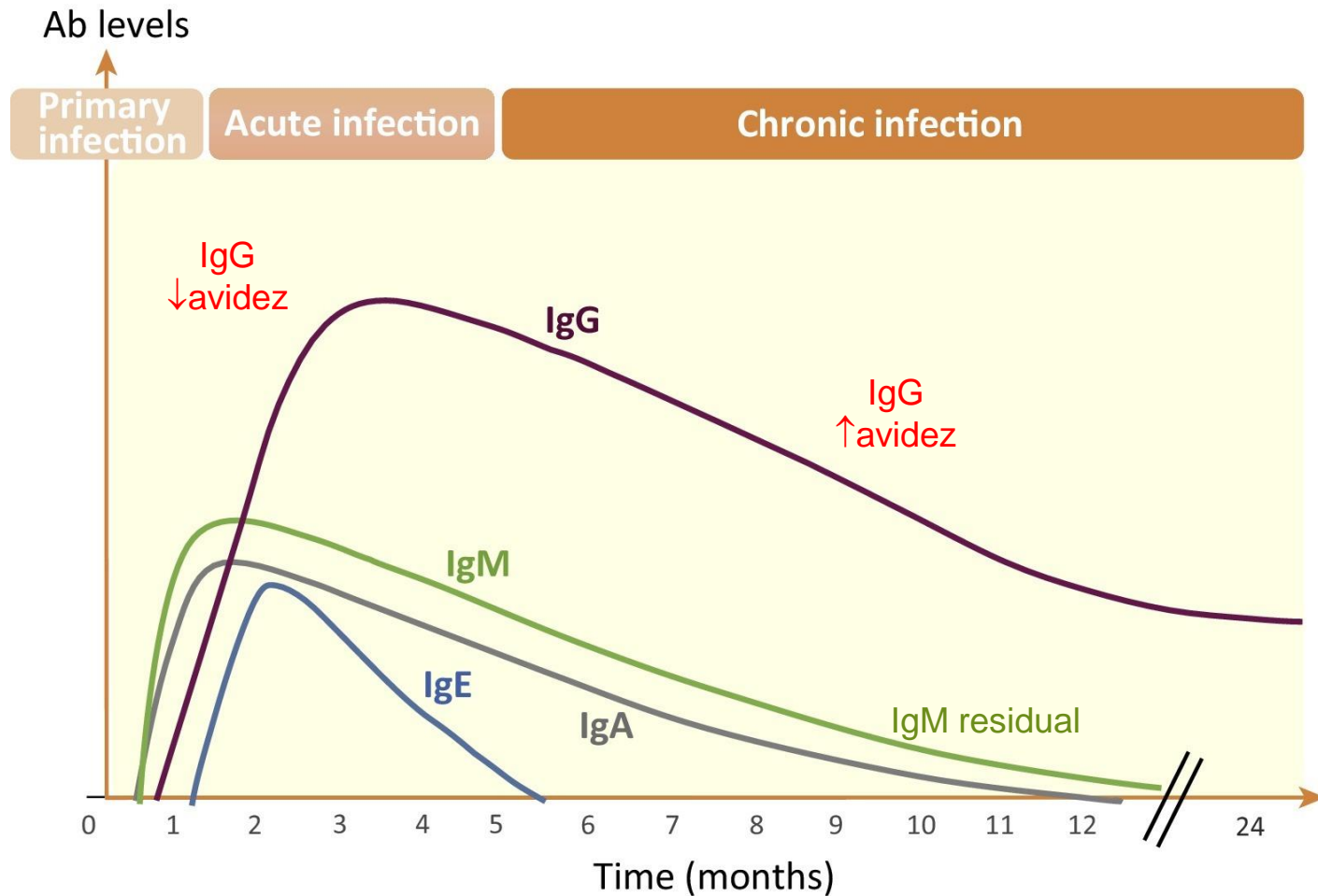
- ELISA: IgG, IgM, IgA e IgE » » »

Teste de avidéz de IgG (para diagnóstico da infecção materna)

- Fase aguda: altos títulos (ou rápida elevação) de IgG de baixa avidéz
- Fase de transição: IgG com avidéz crescente
- Fase crônica: baixos títulos de IgG de alta avidéz

» Em gestantes, a diferenciação entre fase aguda e crônica é essencial

# Perfis sorológicos na toxoplasmose adquirida

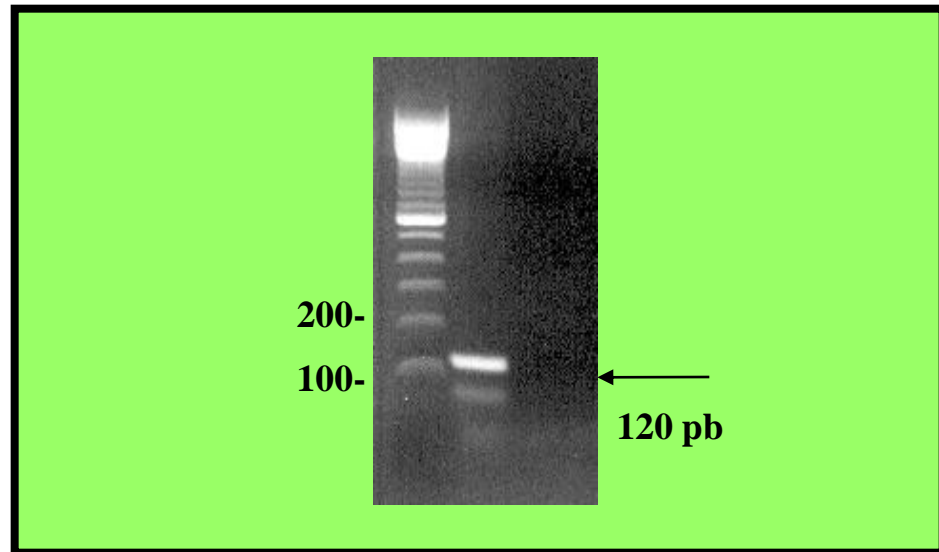


Trends in Parasitology

# Diagnóstico Molecular

- PCR → detecção do DNA do parasita em amostras de sangue periférico, sangue de cordão umbilical, líquido amniótico ou LCR

**Gene B1 de  
*T. gondii***



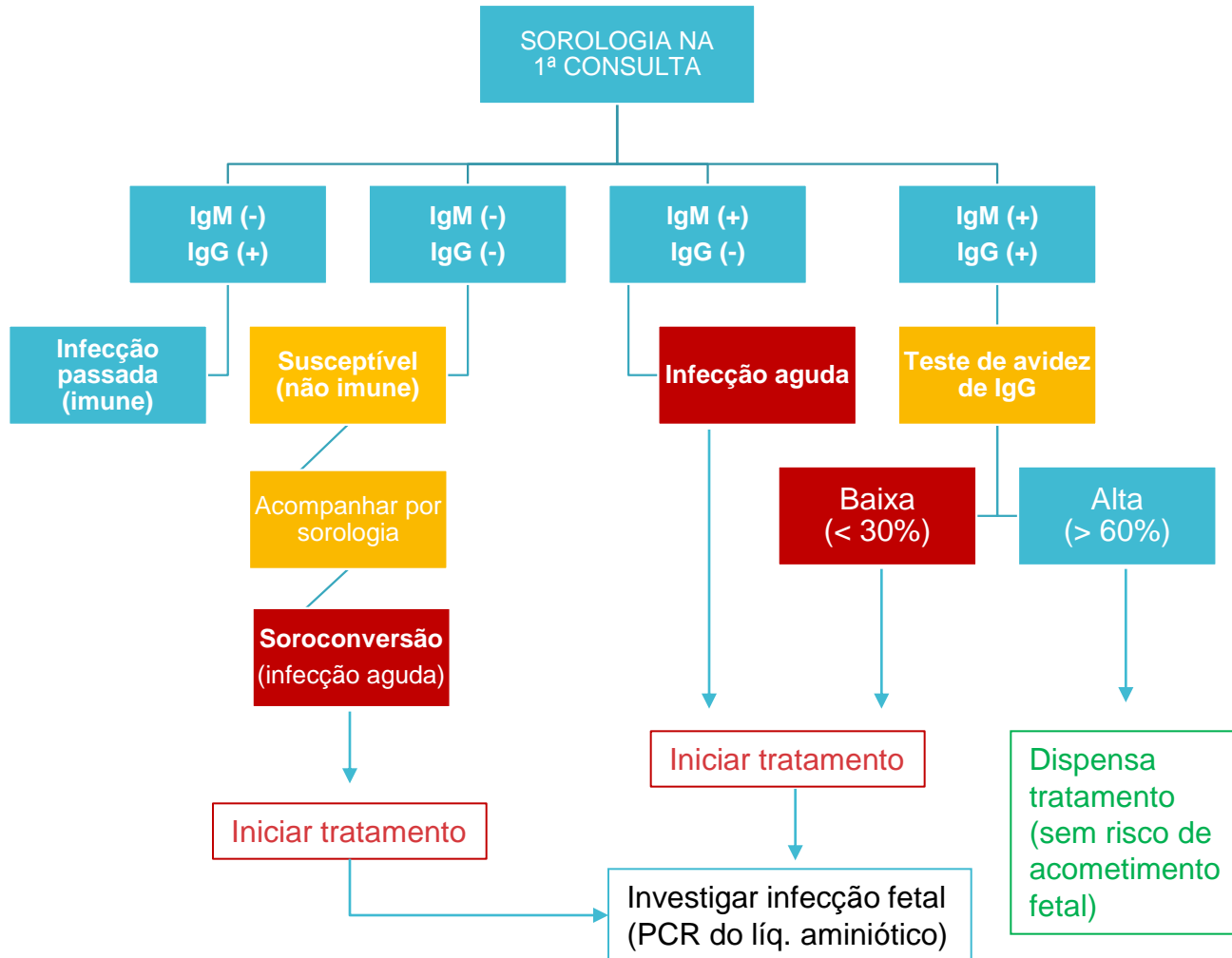
*Pereira-Chioccola (IAL-SP)*

# Diagnóstico laboratorial da Toxoplasmose Congênita

## Investigar:

- **Infecção materna:** rastreamento sorológico » » »
  - Durante o pré-natal, os anticorpos contra o toxoplasma são detectados em cerca de 50% a 80% das mulheres brasileiras
  - Gestantes soronegativas devem ser seguidas durante a gravidez para detecção precoce de soroconversão
- **Infecção Fetal:** parasitológico e PCR (líquido amniótico)  
Ultrassom morfológico
- **Infecção no Recém-Nascido:** parasitológico, sorologia e PCR (sangue periférico ou do cordão umbilical)  
Métodos de imagens, exame oftalmológico

# Diagnóstico da toxoplasmose aguda na gestação



# Aula Prática

## Identificação de *Toxoplasma gondii* em preparações coradas

### Taquizoítas

Forma livre ou trofozoíta;  
Encontrado na fase aguda da infecção

Forma de arco  
(*toxon*=arco)

Forma móvel, de multiplicação rápida  
(*tachis*=rápido)

