

Disciplina BMP0103/5794– Biologia Celular e Molecular de Parasitas

Professores: Carla Claser e Mauro Cortez

**COLORAÇÃO DE ESFREGAÇO SANGUÍNEO (MALÁRIA) E CÉLULAS
INFECTADAS (TOXOPLASMA) POR PANÓTICO RÁPIDO**

Objetivo: Aprender a técnica de esfregaço sanguíneo, coloração, identificação dos parasitas (*Plasmodium berghei* ANKA e *Toxoplasma gondii*) e contagem da parasitemia (malária).

Material de Estudo:

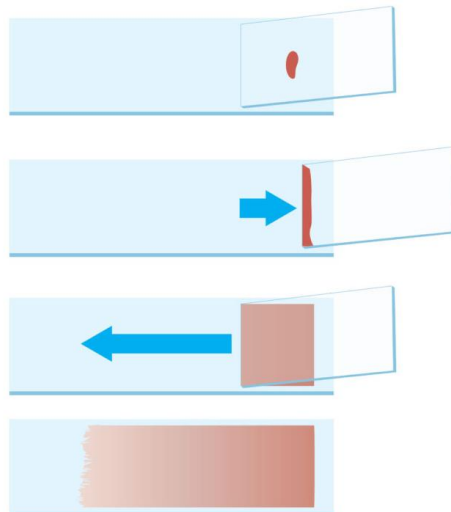
Esfregaço sanguíneo (*Plasmodium*)

Esfregaço de células infectadas com *Toxoplasma gondii*.

Contador manual

Procedimento:

Parte I – preparo do esfregaço (feito previamente pelo docente)



1. O sangue (material fresco) é pingado próximo a uma das extremidades da lâmina (aproximadamente a um ou dois centímetros da extremidade da mesma).
2. Coloca-se uma segunda lâmina com a qual se fará o esfregaço, sobre a face superior da primeira lâmina, de modo que se forme um ângulo de 45°.
3. Faz-se um ligeiro movimento da segunda lâmina para trás, até encostar-se no sangue, deixando que este material se difunda uniformemente, ao longo de toda a borda.
4. Leva-se a segunda lâmina para frente, de forma que ela carregue o material, que se estenderá numa camada delgada e uniforme sobre toda a extensão da primeira lâmina. É essencial escorregar a segunda lâmina sem deter-se. O movimento de extensão deve ser uniforme. O material deverá ser puxado pela segunda lâmina e não empurrada pela mesma, afim de que sejam evitados danos às células.
5. A seguir, secar imediatamente o esfregaço, agitando a lâmina no ar ou com o auxílio de um ventilador.

Parte II – Coloração do esfregaço e das lâminas infectadas (ALUNOS)

As lâminas serão submetidas à coloração pelo Panótico Rápido:

Esfregaço sanguíneo (malária)

- a) 5 segundos no corante 1 (fixador), escorrer o excesso do corante e deixar secar bem.
- b) Colocar no corante 2 (vermelho) por 10 segundos. Tirar o excesso do corante, lavar rapidamente a lâmina num filete de água da torneira.
- c) Colocar no corante 3 (azul) por 30 segundos. Tirar o excesso do corante, lavar rapidamente a lâmina num filete de água da torneira.
- d) Secar à temperatura ambiente.

Esfregaço celular (toxoplasma)

- a) 5 segundos no corante 1 (fixador), escorrer o excesso do corante e deixar secar bem.

- b) Colocar no corante 2 (vermelho) por 15 segundos. Tirar o excesso do corante, lavar rapidamente a lâmina num filete de água da torneira.
- c) Colocar no corante 3 (azul) por 60 segundos. Tirar o excesso do corante, lavar rapidamente a lâmina num filete de água da torneira.
- d) Secar à temperatura ambiente.

Parte III – Identificação dos parasitas (ALUNOS)

Malária

- a) Colocar o esfregaço sanguíneo no microscópio na objetiva 4x ou 10x, acertar o foco da amostra e posteriormente levar para objetiva de 100x, utilizando o óleo de imersão.
- b) Cada grupo, deverá procurar um campo que tenha hemácias infectadas com *Plasmodium*.
 - Identificar as formas do parasita presentes na lâmina;



- Contar o número de hemácias infectadas em 1 campo;
- Liberar o resultado semi-quantitativo em “+ (cruzes)”
 - + = 1 parasita/campo (301-500 p/ mm³)
 - ++ = 2-20 parasitas/campo (501-10.000 p/ mm³)
 - +++ = 21-200 parasitas/campo (10.001-100.000 p/ mm³)
 - ++++ = mais de 200 parasitas/campo (>100.000 p/ mm³)

Toxoplasma

- a) Observação do cisto tissular de *Toxoplasma gondii* em lâminas prontas.

- b) Colocar o esfregaço sanguíneo corado no microscópio na objetiva 4x ou 10x, acertar o foco da amostra e posteriormente levar para objetiva de 100x, utilizando o óleo de imersão.
- c) Cada grupo, deverá procurar um campo que tenha formas infectivas de *Toxoplasma gondii*, isoladas ou no interior de células.