



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Diagnóstico Laboratorial das Infecções
fúngicas e parasitárias (FBC0538)

Métodos Parasitológicos

Profa. Dra. Irene Soares

Colaborador: Valdir Santos (LAC-HU)

São Paulo
2023



I. Método direto

Exame direto a fresco: Deve ser realizado em amostras diarréicas recém-emitidas coletadas, de preferência no próprio laboratório, ou trazidas em um prazo não superior a 30 minutos após a coleta. De preferência, devem ser analisadas as partes fecais mucosas ou sanguinolentas. Este método é utilizado para a pesquisa de trofozoítas, pois permite observar a motilidade dos mesmos. Cistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos também podem ser observados, quando presentes.

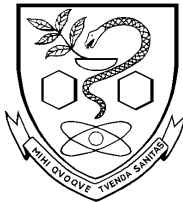
Procedimento:

1. Colocar uma gota de solução salina a 0,85% em uma lâmina de microscopia;
2. Retirar uma pequena porção de fezes do recipiente (aproximadamente do tamanho de um grão de arroz) e emulsificar na solução salina;
3. Cobrir a preparação com uma lamínula;
4. Examinar ao microscópio com objetivas de pequeno (10X) e médio aumento (40X).

Exame direto com lugol: É utilizado para a pesquisa de cistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos.

Procedimento:

1. Colocar uma gota de lugol em uma lâmina de microscopia;
2. Retirar uma pequena porção de fezes do recipiente (aproximadamente do tamanho de um grão de arroz) e emulsificar na solução de lugol;
3. Cobrir a preparação com uma lamínula;
4. Examinar ao microscópio com objetivas de pequeno (10X) e médio aumento (40X).

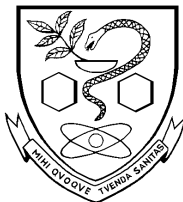


II. Técnica de FAUST

Princípio e Finalidade: Centrífugo – flutuação de cistos de protozoários e ovos leves de helmintos em solução de sulfato de zinco. Ovos de *Schistosoma mansoni*, larvas e ovos inférteis de *Ascaris lumbricoides* podem não ser freqüentemente evidenciados por esse método.

Procedimento:

1. Colocar aproximadamente 2 g de fezes em um copo descartável;
2. Acrescentar aproximadamente 10 mL de água morna aos poucos;
3. Homogeneizar as fezes com auxílio de uma espátula de madeira;
4. Filtrar a suspensão em tubo cônico de 15 mL utilizando gaze dobrada em 4 vezes ou filtro descartável;
5. Centrifugar e centrifugar a 2.500 rpm durante 2 minutos;
6. Decantar o sobrenadante e adicionar ao sedimento cerca de 2 mL de água. Agitar o tubo a fim de ressuspender o sedimento. Completar o volume até 2/3 da capacidade do frasco e centrifugar a 2.500 rpm por 2 minutos. Repetir esta etapa, até que o sedimento apresente-se relativamente claro;
7. Decantar o sobrenadante e adicionar ao sedimento cerca de 2 mL de solução de sulfato de zinco ($d=1.180$). Agitar o tubo a fim de ressuspender o sedimento. Completar o volume até 0,5 mL da borda do tubo;
8. Centrifugar a 2.500 rpm por 2 minutos;
9. Retirar cuidadosamente o tubo da centrífuga e colocá-lo em uma estante;
10. Retirar a película da superfície delicadamente com o auxílio de uma alça dobrada em anel;
11. Colocar as gotas obtidas com a alça de anel sobre uma lâmina, adicionar uma gota de lugol e homogeneizar;
12. Cobrir com uma lamínula e examinar ao microscópio com aumento de 100 e 400X.



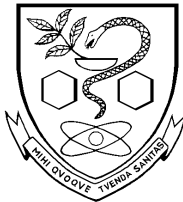
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Preparo da solução de sulfato de zinco ($d=1.180$):

Sulfato de zinco (cristais).....290 g

Água destilada.....670 mL



III. Técnica de WILLIS

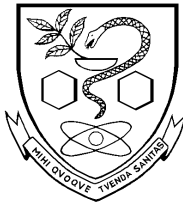
Princípio e Finalidade: Flutuação espontânea de ovos de helmintos em um sistema de solução saturada de cloreto de sódio. Específico para a pesquisa de ovos com densidade baixa, como os de ancilostomídeos, porém outros ovos e cistos podem ser encontrados.

Procedimento:

1. Colocar aproximadamente 2 g de fezes em um copo descartável;
2. Acrescentar aproximadamente 10 a 15 mL de água morna aos poucos;
3. Homogeneizar as fezes com auxílio de uma espátula de madeira;
4. Filtrar a suspensão em tubo cônico de 15 mL utilizando gaze dobrada em 4 vezes ou filtro descartável;
5. Centrifugar a 2.500 rpm durante 2 minutos;
6. Decantar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em solução saturada de NaCl, completando o volume do tubo até formar um menisco com as bordas;
7. Colocar uma lâmina sobre a boca do tubo em contato com a solução, evitando formar bolhas de ar;
8. Deixar em repouso durante 30 a 45 minutos;
9. Retirar a lâmina virando-a bruscamente, colocar uma gota de lugol, cobrir com uma lamínula e examinar ao microscópio com aumento de 100X e 400X.

Preparo da solução saturada de cloreto de sódio:

Adicionar cloreto de sódio (NaCl) em água destilada até que o excesso acrescentado não mais se dissolva na solução (aproximadamente 40 g de NaCl em 100 mL de água).

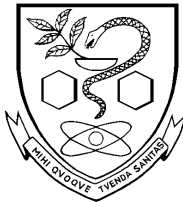


IV. Técnica de HOFFMAN (LUTZ; HOFFMAN, PONS & JANER)

Princípio e Finalidade: Sedimentação espontânea em água (combinação da gravidade e da sedimentação) de cistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos. É o método de escolha para pesquisa de ovos pesados, como os de *Schistosoma mansoni* e também ovos operculados.

Procedimento:

1. Colocar aproximadamente 2 g de fezes em um copo descartável;
2. Acrescentar aproximadamente 20 mL de água morna aos poucos;
3. Homogeneizar as fezes com o auxílio de um palito de madeira;
4. Transferir para um cálice afinilado coando em peneira descartável;
5. Acrescentar água da torneira até encher o cálice;
6. Deixar em repouso até a sedimentação (2 a 24 horas);
7. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur ou canudo plástico recolher o sedimento e colocar sobre uma lâmina contendo uma gota de lugol;
8. Homogeneizar o preparado com auxílio do canudo e cobrir com lamínula;
9. Examinar ao microscópio em aumento de 100 e 400X.
10. No caso de pesquisa de *S. mansoni*, examinar ao microscópio no mínimo 5 lâminas ou por esgotamento do sedimento.



V. Técnica de RITCHIE

Princípio e Finalidade: É fundamentado no processo de centrífugo-sedimentação de cistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos em um sistema de formalina – éter (ou acetato de etila), que facilita a eliminação de gorduras e impede deformações dos mesmos.

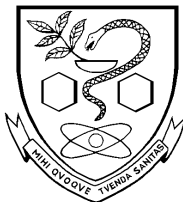
Procedimento:

Técnica I.

1. Colocar aproximadamente 1 ou 2 g de fezes em um copo descartável;
2. Acrescentar aproximadamente 20 mL de água morna aos poucos;
3. Homogeneizar totalmente as fezes com o auxílio de um palito de madeira
4. Transferir para um cálice afunilado coando em peneira descartável;
5. Transferir para um tubo de centrífuga e centrifugar a 2.500 rpm durante 2 minutos;
6. Decantar o sobrenadante e agitar até que o sedimento se desprenda do fundo do tubo;
7. Adicionar 5 mL de formol a 10% e 2 mL de éter ou acetato de etila;
8. Fechar o tubo e agitar vigorosamente;
9. Centrifugar novamente a 2.500 rpm durante 3 minutos;
10. Decantar o sobrenadante, limpar as paredes do tubo com cotonete e agitar até que o sedimento se desprenda do fundo do tubo;
11. Adicionar 2 gotas de lugol ao sedimento, homogeneizar, colocar sobre uma lâmina e examinar ao microscópio com aumento de 100 e 400X.

Técnica II.

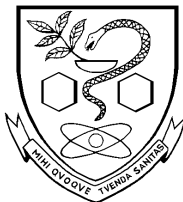
1. Homogeneizar aproximadamente 1 ou 2 g de fezes sem conservante em 10 mL de solução de formalina a 10%. No caso de fezes já mantidas em conservante completar o volume para 10 mL e homogeneizar;
2. Filtrar a suspensão diretamente em tubo cônico plástico e centrifugar a 2.500 rpm por 2 minutos;



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

3. Decantar e agitar o tubo até que o sedimento se desprenda do tubo;
4. Adicionar ao sedimento 5 mL de formalina a 10% e 2 mL de éter;
5. Fechar o tubo e agitar vigorosamente;
6. Remover a tampa do tubo e centrifugar a 2.500 rpm por 3 minutos;
7. Decantar o sobrenadante, limpar as paredes do tubo com cotonete e adicionar ao sedimento 2 gotas de lugol. Homogeneizar;
8. Colocar uma gota sobre a lâmina, cobrir com lamínula e observar ao microscópio no aumento de 100 e 400X.

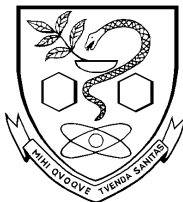


VI. Técnica de BAERMANN (modificado e adaptado por MORAES)

Princípio: Esse método fundamenta-se no termo e hidrotropismo positivo das larvas de nematóides, principalmente de *Strongyloides stercoralis*, e na tendência destas de sedimentar espontaneamente quando em água morna, na temperatura entre 40 e 45°C.

Procedimento:

1. Encher o funil com água corrente, aquecida a 40-45°C;
2. Abrir a pinça de *Mohr*, deixando escorrer uma pequena quantidade de água para evitar a formação de bolhas de ar na haste e no tubo de borracha;
3. Espalhar 10 g de fezes em um filtro descartável. Adaptar o filtro ao funil e, se necessário, colocar mais água de modo que as fezes fiquem submersas;
4. Deixar em repouso durante 60 minutos;
5. Abrir a pinça e coletar 3 a 5 mL da suspensão em vidro relógio;
6. Examinar ao microscópio com aumento de 40 e 100X.

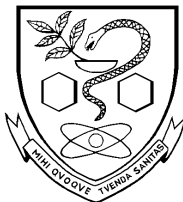


VII. Técnica de RUGAI e colaboradores

Princípio e Finalidade: O mesmo da Técnica de Baermann.

Procedimento:

1. Envolver a tampa ou o próprio recipiente contendo as fezes com uma gaze dobrada em duas partes repuxando as bordas para trás;
2. Embocar o recipiente com abertura voltada para baixo em cálice cônico com capacidade de 125 a 200 mL, fixando-o por pressão contra as paredes, em posição levemente inclinada. No cálice de sedimentação deve conter água aquecida (40-45°C), em quantidade suficiente para entrar em contato com toda a extensão da abertura do recipiente. Evitar a formação de bolhas de ar;
3. Deixar em repouso por 90 minutos;
4. Retirar o recipiente e coletar o sedimento no fundo do cálice com o auxílio de uma pipeta;
5. Examinar o sedimento corado pelo lugol entre lâmina e lamínula.



VIII. Técnica de KATO (Modificado por KATZ e colaboradores)

Princípio e Finalidade: Determinação qualitativa e quantitativa de ovos de helmintos pesados nas fezes, principalmente de *Schistosoma mansoni*. Não é indicado para o diagnóstico de larvas de helmintos e cistos de protozoários.

Procedimento:

- Preparar uma solução de verde de malaquita.

A finalidade do verde de malaquita será conservar e clarificar as fezes a serem examinadas.

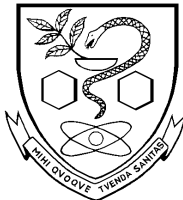
Fórmula:

Glicerina100 mL

Água destilada.....100 mL

Verde de malaquita 3%.....1 mL

1. Cortar em pedaços de 24 mm por 30 mm papel celofane semipermeável e deixá-los mergulhados na solução de verde de malaquita por 24 horas;
2. Colocar uma pequena porção de fezes em um pedaço de papel toalha;
3. Comprimir a tela de náilon sobre as fezes, de modo que parte das fezes seja filtrada através da tela e se acumulem no topo. Nessa malha passará apenas ovos de helmintos e detritos menores;
4. Raspe com uma espátula a superfície superior da tela para retirar as fezes filtradas e transfira o conteúdo para um cartão retangular contendo no centro um orifício de 6 mm que deve estar sobre uma lâmina;
5. Após preencher completamente o orifício, retirar o cartão cuidadosamente deixando o cilindro de fezes na lâmina;
6. Cubra o material fecal com a lamínula de papel celofane embebido na solução, inverta a lâmina e pressione firmemente a amostra de fezes contra o papel celofane sobre

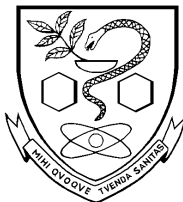


UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

outra lâmina de microscópio. O material fecal vai se espalhar entre a lâmina de microscópio e o papel celofane;

7. Aguardar 1-2 horas e examinar ao microscópio;
8. O número de ovos presentes no esfregaço fecal multiplicado pelo fator 24 para uma base de 47,1 mg de fezes, corresponderá ao número de ovos por gramas de fezes (OPG).



IX. Técnica de Coloração pelo Tricrômico: Wheatley

Princípio e Finalidade: Fundamenta-se na coloração de cistos e trofozoítas pelo tricrômico, os quais tomam a cor verde-azulada. A cromatina nuclear, corpos cromatóides, hemácias e bactérias coram-se de vermelho ou púrpura escuro. O material de fundo, usualmente cora-se em verde, contrastando com o protozoário.

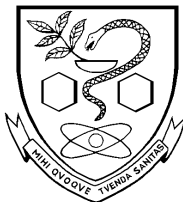
Amostra: material fecal não preservado

Procedimento:

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
2. Fixador de Schaudinn, cinco minutos a 50°C, ou uma hora à temperatura ambiente.
3. Solução de álcool etílico a 70% iodado, um minuto.
4. Álcool etílico a 70% (1), um minuto.
5. Corante tricrômico, 2-8 minutos.
6. Solução álcool-ácido, 5-10 segundos.
7. Álcool etílico a 95% (1), lavar rapidamente.
8. Álcool etílico a 95% (2), lavar rapidamente.
9. Álcool etílico absoluto ou carbol-xileno, um minuto.
10. Xilol, 1-3 minutos.
11. Montagem com resina sintética (Cytoseal 60).

Reagentes:

1. Fixador de Schaudinn
2. Álcool etílico a 70%, 90% (v/v) (C_2H_5O)
3. Álcool etílico absoluto (C_2H_5O)
4. Chromotrope 2R (CI 16570) ($C_{16}H_{10}N_2Na_2O_8S_2$)
5. Light green SF (CI 42095) ($C_{37}H_{34}N_2O_2S_3Na_2$)



6. Fast green FCF (CI42053) ($C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3$)
7. Ácido fosfotúngstico ($24WO_3 \cdot 2H_3PO_4 \cdot 48H_2O$)
8. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
9. Carbol-Xilol (Fenol-xileno)
10. Xilol (Xileno) (C_8H_{10})
11. Resina sintética (Cystoseal 60)

Preparação das Soluções:

1. Corante Tricrômico, segundo Brooke

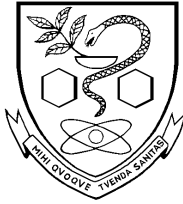
Chromotrope 2R	0,6 g
Light green.....	0,15 g
Fast green FCF.....	0,15 g
Ácido fosfotúngstico.....	0,70 g
Ácido acético Glacial.....	1,0 mL
Água destilada-deionizada.....	100 mL

- Colocar os componentes secos em um beaker e adicionar 1 mL de ácido acético glacial. Agitar a mistura e deixar em repouso 30 minutos para “amadurecer”. Adicionar 100 mL de água. O corante é estável e não deve ser diluído. Apresenta uma cor púrpura forte quase preta.

2. Solução de Álcool – Ácido

Ácido acético glacial.....	4,5 mL
Álcool etílico a 90%.....	95,5 mL

- Adicionar o ácido acético ao álcool etílico e estocar em frasco de vidro com tampa esmerilhada. Conservação indefinida.



X. Técnica de coloração para coccídios intestinais: Kinyoun (a frio)

Princípio e Finalidade: Fundamenta-se na coloração dos oocistos de coccídios, pela fucsina carbólica, que tem sido descrita como álcool ácido resistente-variável, apresentando uma coloração do rosa ao vermelho púrpura intenso, usando-se um corante de fundo (verde de malaquita ou azul de metileno). Específico para pesquisa de coccídios intestinais.

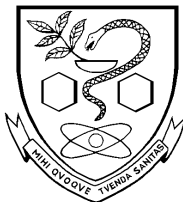
Procedimento (Formol – Éter modificado):

Procedimento 1 - Preparação

1. Homogeneizar cerca de 1 a 2 gramas de fezes (preservadas em formalina) em 10 mL de solução de formalina a 10%;
2. Filtrar 4 mL da suspensão diretamente em tubo cônico de plástico e adicionar 2 mL de éter sulfúrico;
3. Fechar o tubo e agitar vigorosamente por 1 minuto;
4. Centrifugar a 1.500 rpm por 8 minutos;
5. Decantar o sobrenadante e remover os detritos das paredes do tubo com o auxílio de um cotonete;
6. Ressuspender o sedimento e com auxílio de um canudo plástico, colocar na lâmina 1 ou 2 gotas de fezes concentradas (não fazer o esfregaço muito espesso);
7. Deixar secar o esfregaço à temperatura ambiente.

Procedimento 2 - Coloração

1. Fixar a lâmina com álcool metílico por 30 segundos;
2. Deixar secar a temperatura ambiente;
3. Corar com corante de Kinyoun por 30 minutos à temperatura ambiente;
4. Lavar com água;
5. Cobrir com álcool-ácido por 2 minutos;



6. Lavar com água;
7. Cobrir com álcool-ácido por 2 minutos;
8. Cobrir toda a Lâmina com azul de metileno ou verde de malaquita por 3 ou 4 minutos;
9. Lavar com água e deixar secar;
10. Examinar 200 a 300 campos, com objetiva de maior aumento (100X).

Preparo das Soluções:

1. Corante de Kinyoun (Solução de fucsina – carbólica)

Fucsina básica.....	4,0 g
Fenol fundido a 44°C.....	8,0 mL
Álcool etílico a 95% 9v/v).....	20,0 mL
Água destilada q.s.p.....	100 mL

Dissolver a fucsina básica no álcool etílico e adicionar a água lentamente com agitação. Adicionar 8 mL de fenol ao corante, com uma pipeta com bulbo de borracha.

Nota: O corante Fuchsin-Carbol (Kinyoun Acid Fast) pode ser adquirido comercialmente.

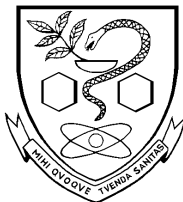
2. Solução de Álcool-ácido sulfúrico a 10%.

Ácido sulfúrico concentrado.....	10 mL
Álcool etílico absoluto.....	90 mL

Armazenar a temperatura ambiente. Estável por 1 ano.

3. Solução de Verde de malaquita a 3% ou Azul de metileno a 1%.

Verde de malaquita.....	3,0 g
Água destilada q.s.q.....	100 mL



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Ou

Azul de metileno.....1,0 g

Água destilada q.s.q.....100 mL

Armazenar a temperatura ambiente. Estável por 1 ano.