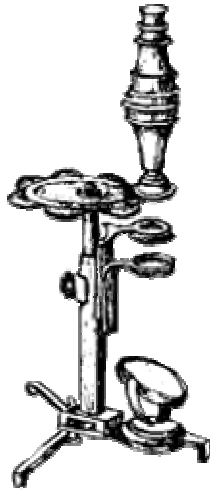


HELOISA WERNECK DE MACEDO

EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES (EPF)



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

NITERÓI / RJ

2010

EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES (EPF)

O EPF faz o diagnóstico da maioria dos parasitos intestinais. Os estágios usuais utilizados no diagnóstico são os ovos e as larvas de helmintos e os trofozoítas, cistos e oocistos de protozoários.

A identificação desses parasitos é feita por critérios morfológicos, que podem ser afetados por vários fatores como colheita mal feita e má preservação da amostra. Um material fecal inadequadamente colhido, velho ou mal preservado, será de pequeno valor para o diagnóstico.

É necessária uma boa experiência do microscopista porque freqüentemente fragmentos de alimentos, células vegetais, grãos de pólen, leucócitos, células de tecido animal e outros artefatos presentes nas fezes, podem assemelhar-se a certos estágios dos parasitos intestinais.

COLHEITA E PRESERVAÇÃO DA AMOSTRA

Vários fatores devem ser considerados para uma colheita adequada do material fecal: tipo de recipiente, volume, idade da amostra, drogas e compostos químicos que podem interferir no resultado do exame.

Recipiente: deve ser limpo e seco, com boca larga, com vedação hermética para impedir o derrame, permitindo a preservação da umidade. Deve ter capacidade de aproximadamente 150 ml, para que possa receber uma amostra significativa. Deve estar livre de anti-sépticos, de agentes germicidas, de gotas de óleo e de urina, para evitar a destruição das formas vegetativas.

Fezes excretadas no solo não devem ser usadas, pois larvas de vida livre e outros contaminantes provenientes do solo, podem confundir o diagnóstico. Fezes obtidas de vasos sanitários também não podem ser aproveitadas, devido ao risco de contaminação. Elas devem ser colhidas diretamente no frasco, ou em urinol e transferidas diretamente para o recipiente.

Interferência de medicamentos e de produtos químicos: certos medicamentos e produtos químicos podem tornar a amostra insatisfatória para a análise ou para a pesquisa dos protozoários intestinais. Entre estes estão os antidiarréicos, os antibióticos, os antiácidos, os derivados de bismuto e do bário, a vaselina e os óleos minerais. As amostras excretadas que contenham bário ou bismuto são inaceitáveis

para o EPF, porque partículas desses produtos podem interferir no exame, uma vez que excesso de substâncias cristalinas pode destruir os trofozoítas, devido à ação abrasiva. A pesquisa parasitológica deve ser realizada antes do paciente ser submetido a um exame radiológico com administração do contraste sulfato de bário. Nesse caso, a coleta deve ser retardada por um período de 7 a 10 dias. Os antibióticos como a tetraciclina afetam a flora intestinal normal e freqüentemente causam diminuição ou ausência temporária dos organismos nas fezes, visto que esses parasitos se alimentam de bactérias intestinais e um diagnóstico seguro só é possível após 2 a 3 semanas do término do antibiótico.

IMPORTÂNCIA DO EPF EM AMOSTRAS MÚLTIPLAS

A possibilidade de encontrarmos organismos parasitários no EPF aumenta pelo exame de amostras múltiplas, devido a vários fatores como:

1. Intermitência da eliminação de certos parasitos, principalmente protozoários;
2. Distribuição não uniforme dos ovos dos helmintos nas fezes;
3. Estágio dos protozoários;
4. Limitação das técnicas.

O número de cistos de *Entamoeba histolytica* que passam junto com as fezes, apresenta oscilações diárias e picos cíclicos que ocorrem entre 7 e 10 dias, e os de *Giardia lamblia* entre 2 – 3 dias ou mais. A produção de ovos de *Schistosoma* é irregular, assim como as proglotes de *Taenia* são liberadas com interrupções de 2 a 3 dias. Dessa forma, a colheita das fezes em dias alternados propicia uma porcentagem maior de resultados positivos. O ideal é colher uma série de 6 amostras em dias alternados, dentro de 14 dias. No entanto recomenda-se usualmente coleta de três amostras em dias alternados.

CONTROLE PÓS-TRATAMENTO

Um novo exame deverá ser realizado, 3 a 4 semanas após o tratamento dos pacientes que receberam medicação para protozoários. Para infecções por helmintos, o controle se efetuará uma a duas semanas após o tratamento, mas para a teníase, um novo exame será necessário após 5 a 6 semanas.

LAXANTES

O uso de laxantes é recomendado nos casos de uma série de EPF com resultados negativos. São recomendados laxantes salinos como o fosfato de sódio e o sulfato de sódio tamponado, porque causam menos danos morfológicos aos parasitos. Não são indicados os óleos minerais, os compostos de bismuto ou magnésio, pois os glóbulos de óleo dificultam a observação e os restos de cristais de bismuto e de magnésio podem obscurecer os organismos ou afetar a aparência dos trofozoítas.

ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS

O tempo de colheita das amostras influi bastante na identificação dos parasitos. Os trofozoítas dos protozoários se degeneram rapidamente após terem sido eliminados. Como estão geralmente presentes em espécimes líquidos, o tempo de exame recomendado é de 30 minutos. Para fezes sólidas o limite de tempo não é crítico, podendo o estudo ser feito dentro de 24 horas.

PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para preservar a morfologia dos protozoários e prevenir um contínuo desenvolvimento de alguns ovos e larvas de helmintos, as amostras fecais que não forem enviadas imediatamente ao laboratório, deverão ser fixadas.

Refrigeração: a preservação das amostras poderá ser temporariamente feita por refrigeração (3 a 5°C) em recipiente hermeticamente fechado, para evitar o dessecamento. Nessas temperaturas os ovos e as larvas dos helmintos se manterão viáveis por vários dias.

Fixadores: a preservação permanente poderá ser conseguida com a utilização de vários fixadores como:

1. solução de formaldeído 5% ou 10%;
2. mertiolato-iodo-formaldeído (MIF);
3. acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF);
4. fixador de Schaudinn.

Solução de Formaldeído: são recomendadas duas concentrações: 5% para fixação de cistos de protozoários e 10% para ovos e larvas de helmintos. Os ovos de *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* continuam o seu desenvolvimento na concentração de 5%.

Fixador de Schaudinn: essa solução é usada para a preparação de esfregaços permanentes, corados para a demonstração de protozoários intestinais. O grande problema desse fixador é a presença de cloreto de mercúrio-II na fórmula, que é uma substância tóxica ao homem e ao meio ambiente. Ele pode ser substituído pelo sulfato de cobre.

FIXADORES

Solução de formaldeído a 5%

Formaldeído 37-40% 5 ml
Água destilada-deionizada95 ml

Solução de formaldeído a 10%

Formaldeído 37-40%10ml
Água destilada-deionizada90ml

Metiolato-iodo-formaldeído (MIF)

Mercúrio cromo40 ml
Formaldeído 37-40%50ml
Glicerina10 ml
Água destilada-deionizada90ml

Acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF)

Acetato de sódio..... 1,5 g
Ácido acético glacial..... 2,0 ml
Formaldeído 37-40%..... 4,0 ml
Água destilada-deionizada.....92,5 ml

Fixador de Schaudinn (veneno)

1. Solução aquosa saturada de Cloreto de Mercúrio-II (HgCl_2)

HgCl_2 110g
Água destilada-deionizada.....1000 ml
Dissolver o HgCl_2 em água quente (banho de água até completa dissolução do sal.
Deixar esfriar e filtrar. Estocar em recipiente de vidro com tampa esmerilhada).

2. Solução estoque

Solução (1).....600 ml
Álcool etílico a 95%.....300 ml

Glicerina.....15 ml

3. Solução fixadora

Solução estoque.....100 ml

Ácido acético glacial.....5 ml

Obs: Adicionar o ácido acético imediatamente antes do uso.

TÉCNICAS

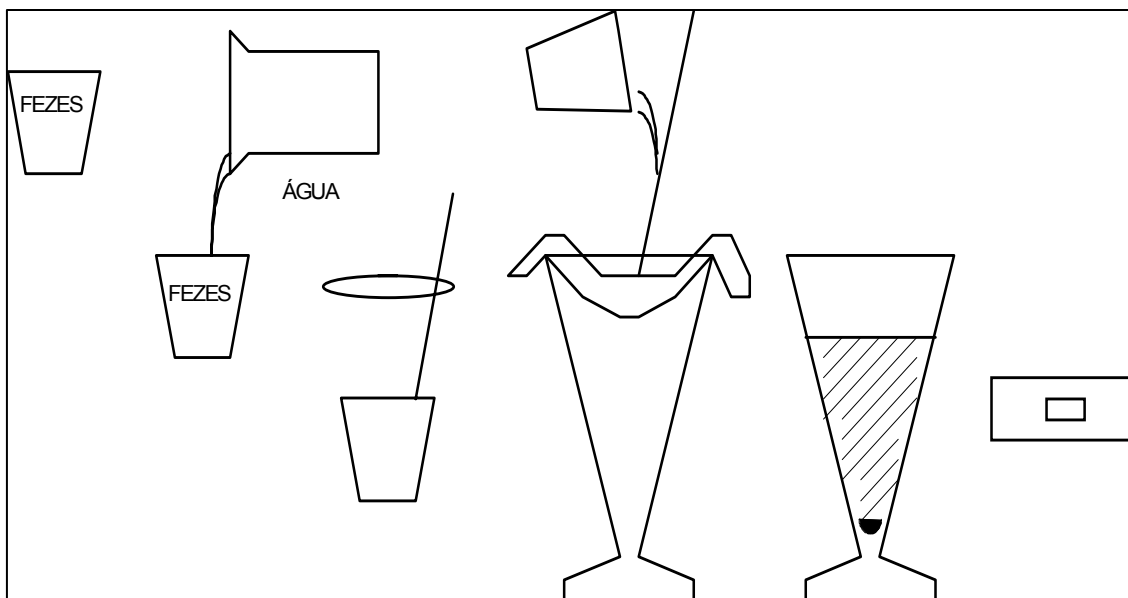
Exame direto

1. Tomar uma pequena porção do material a examinar e misturar, se necessário, com pequena quantidade de solução salina a 9 o/oo sobre uma lâmina.
2. Cobrir com lamínula e examinar.

Método de Hoffman, Pons e Janer (sedimentação espontânea)

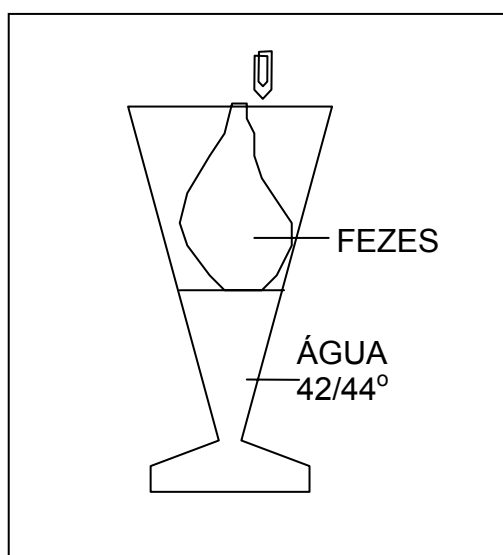
1. Preparar uma suspensão de 1 parte de fezes, para aproximadamente 10 partes de água.
2. Filtrar para cálice de sedimentação, usando gaze dobrada 4 vezes e acrescentar mais água até que o nível líquido fique a aproximadamente 2 cm da borda do cálice.
3. Deixar sedimentar, no mínimo, por 2 horas.

Executar a leitura do sedimento entre lâmina e lamínula.



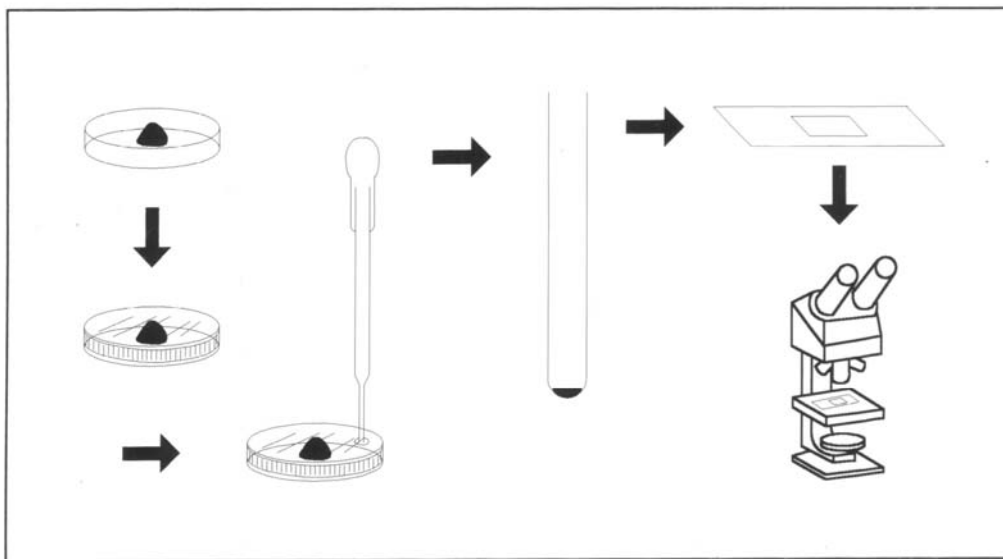
Método de Rugai (hidro e termo tropismo das larvas)

1. Colocar cerca de 3 a 4g de fezes no centro de um quadrilátero de gaze, previamente dobrada 4 vezes.
2. Unir as pontas da gaze em diagonal e fixar o conjunto na borda de um cálice de sedimentação com o auxílio de um "clips" para papel.
3. Colocar água à temperatura de 40 a 42 graus centígrados pelas paredes do cálice, de forma que as fezes fiquem parcialmente submersas. Deixar em repouso por 1 hora.
4. Retirar com uma pipeta uma amostra do líquido do fundo do cálice e examinar.



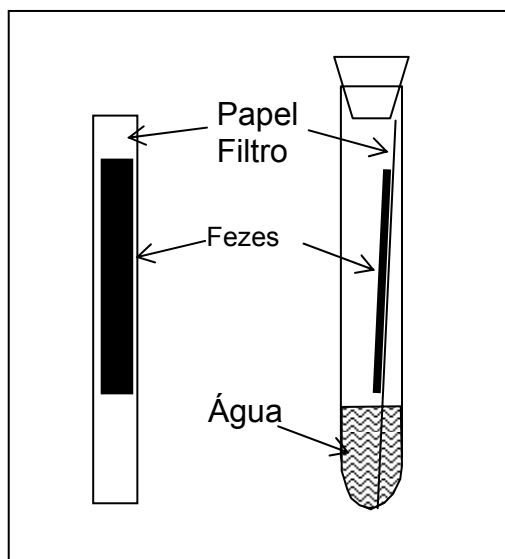
Método de cultura em placa de ágar

1. Usar meio de ágar constituído de peptona de carne (10g/l), extrato de levedura (2g/l), peptona de caseína (5g/l), Infuso de carne (3g/l), cloreto de sódio (5g/l), ágar (1,5g/l), pH 7,3.
2. Autoclavar o meio e distribuí-lo em placas de plástico de 9,0 cm de diâmetro e 2,5 cm de profundidade.
3. Embalar as placas de ágar em papel pardo, separadamente, e guardá-las em geladeira a 4°C.
4. Aproximadamente 2g de fezes devem ser colocados na parte central das placas e, após serem fechadas, as tampas devem ser vedadas com fita adesiva para evitar contaminação.
5. Manter as placas por 48 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as tampas serão perfuradas com a ponta de uma pipeta Pasteur superaquecida e através do orifício, adicionados 5 ml de formol a 5%.
6. Todo o conteúdo líquido deverá ser aspirado das placas, transferido para tubo cônico plástico de 15 ml e centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos.
7. Os sedimentos obtidos após a centrifugação, serão corados com solução de lugol e examinados ao microscópio óptico.



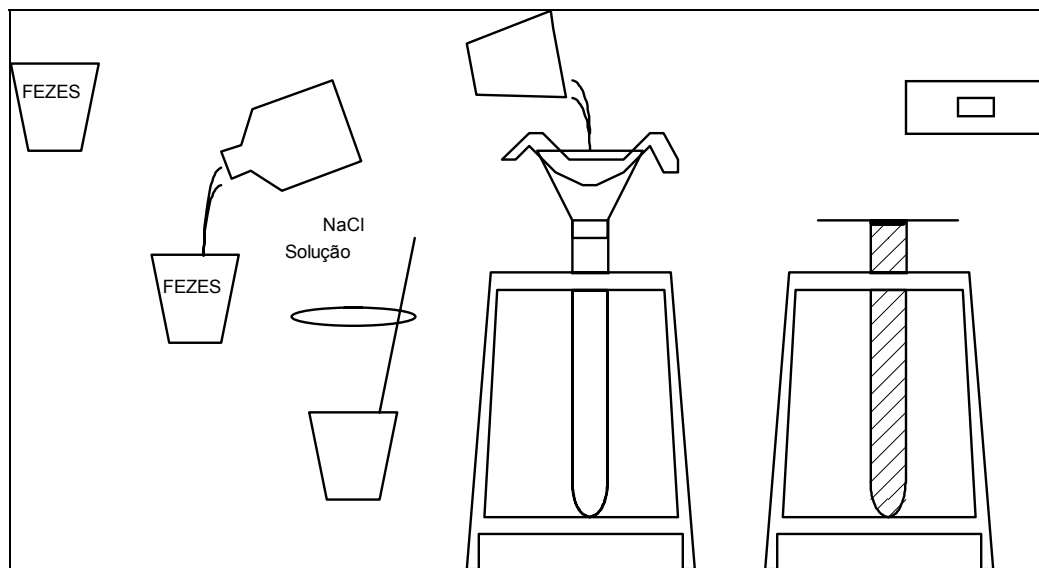
Método de HARADA & MORI

1. Preparar uma fita de papel-filtro de 15 X 1 cm ou 15 X 2 cm.
2. Espalhar 0,5 g de fezes frescas no papel-filtro, fazendo um esfregaço fino e uniforme, em um dos lados da fita, exceto nas áreas de 4 cm distante de ambas as extremidades.
3. Introduzir a fita de papel-filtro em tubo de ensaio de 18 X 180 mm ou 20 X 200 mm, contendo 4 a 5 ml de água destilada-deionizada ou fervida, de maneira que a água não entre em contato com as fezes.
4. Fechar o tubo com rolha de borracha, conservando-o em posição vertical por 10 a 14 dias, à temperatura de 25-30°C.
5. Colher com pipeta a água do fundo do tubo e observar ao microscópio se existem larvas filariformes.
6. Em caso positivo, colocar o tubo em banho de água a 50°C por 15 minutos para matar as larvas. Transferir a água para um tubo de centrifuga e centrifugar (500 X g por 1 minuto).



Método de Willis (flutuação)

1. Preparar uma suspensão de fezes em solução saturada de cloreto de sódio na proporção de 1:10.
2. Filtrar em gaze dobrada 4 vezes, para um tubo de Wassermann, até bem próximo da borda. Com uma pipeta ou conta-gotas, acrescentar mais solução até a formação de um menisco positivo.
3. Colocar uma lamínula sobre o tubo, de forma que entre em contato com o líquido. Deixar em repouso por 5 a 10 minutos.
4. Transferir a lamínula para uma lâmina com uma gota de lugol e examinar.



Método de Faust (flutuação com sulfato de zinco)

1. Preparar uma suspensão, utilizando uma parte de fezes para 10 partes de água.
2. Filtrar em gaze dobrada 4 vezes para um tubo de Wassermann (13 x 100mm).
3. Centrifugar por 1 minuto a 2500 r.p.m.; decantar o sobrenadante, adicionar 2 a 3ml de água ao sedimento e misturar bem; acrescentar mais água, até atingir o volume inicial e misturar novamente.
4. Repetir a operação de lavagem do sedimento (item 3), sempre completando o volume inicial, até que o sobrenadante fique claro.
5. Decantar o líquido sobrenadante da última lavagem e misturar o sedimento com 2 a 3ml de solução de sulfato de zinco, com densidade de 1.180 (apr. 33g%); acrescentar mais solução de sulfato de zinco, até atingir o volume inicial e misturar.
6. Centrifugar por 1 minuto a 2500 r.p.m..
7. Retirar da película superficial da solução de sulfato de zinco, por meio de uma alça de platina, o material a ser examinado. Corar com lugol e examinar.

Método de Sheather (flutuação com açúcar)

1. Fundamento: centrifugo-flutuação de possíveis estruturas parasitárias por sol. de glicose com densidade de 1.235 a 1500.
2. Homogeneizar 1 a 2 g de fezes com aproximadamente 5 a 10 volume de água.
3. Filtrar passando por gaze dobrada 4 vezes em um funil pequeno sobre um tubo de centrifuga até a metade do tubo, completando com água.
4. Centrifugar – 2500 rpm por 2 minutos e decantar.
5. Desprender o material do fundo do tubo por batidas com a lateral dos dedos e colocar até aproximadamente o meio do tubo, solução de glicose de densidade entre 1.235 – 1500.
6. Centrifugar a 2000 - 2500 rpm por 1 minuto.
7. Retirar com cuidado a película superficial com alça de platina.
8. Colocar 4 a 5 porções da película na lâmina.
9. Examinar em objetiva de pequeno aumento (10X) e posteriormente aumento (40X).

10. Obs: Fórmula da Densidade

$$D = m/v$$

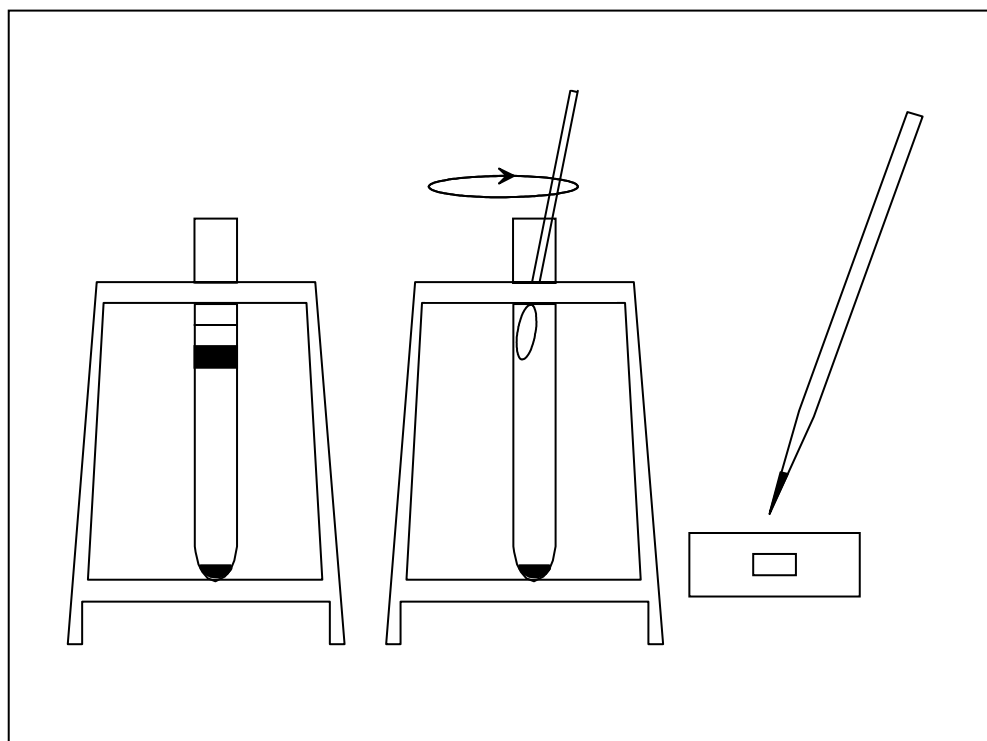
$$\text{Ex. } 1.300 = m/500 \text{ mL}$$

$$m = 650 \text{ g}$$

Pesar 650 g e adicionar 500 ml de água.

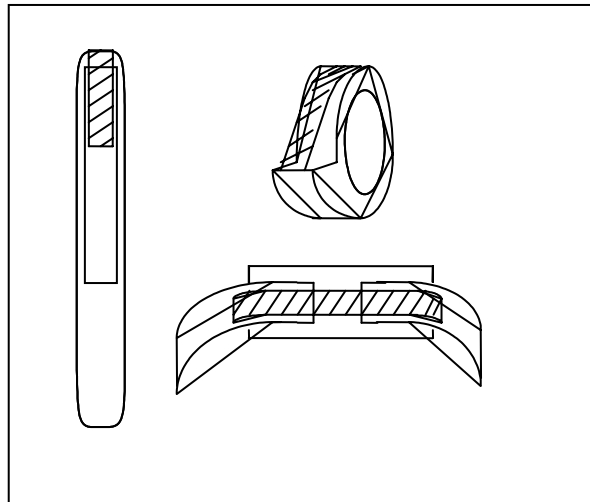
Método de Ritchie

1. Preparar uma suspensão com uma parte de fezes para 10 partes de água.
2. Filtrar, através de gaze dobrada 4 vezes, para um tubo de centrifugação.
3. Centrifugar durante um minuto a 2000 r.p.m.; decantar o sobrenadante.
4. Lavar o sedimento com água até que o sobrenadante fique límpido.
5. Misturar o sedimento com solução de formol a 7.5%, em volume suficiente para alcançar 2/3 da altura total do tubo. Agitar bem.
6. Deixar em repouso por 20 a 30 minutos.
7. Adicionar pequena quantidade de éter, tampar o tubo e agitar vigorosamente.
8. Centrifugar a 1500 r.p.m., durante 1 minuto.
9. Decantar o sobrenadante; Remover, com um bastonete provido de algodão em uma das extremidades, os detritos superficiais aderidos à parede do tubo.
10. Examinar o sedimento corado pelo lugol.



Método de Graham (pesquisa de ovos de *Enterobius vermicularis*)

1. Colar, em lâmina limpa e desengordurada, fita adesiva de celofane com aproximadamente 10 cm de comprimento por 1,2 cm de largura.
2. Nas extremidades que excedem o comprimento da lâmina, fazer aderir tiras de papel nas mesmas dimensões da fita gomada.
3. Na ocasião do exame, retirar cuidadosamente a fita de celofane e pressionar a superfície com o adesivo sobre as regiões anal e perianal do paciente.
4. Colar a fita novamente na lâmina, tendo o cuidado de evitar dobras ou bolhas de ar.
5. Examinar ao microscópio com objetiva de pequeno aumento.

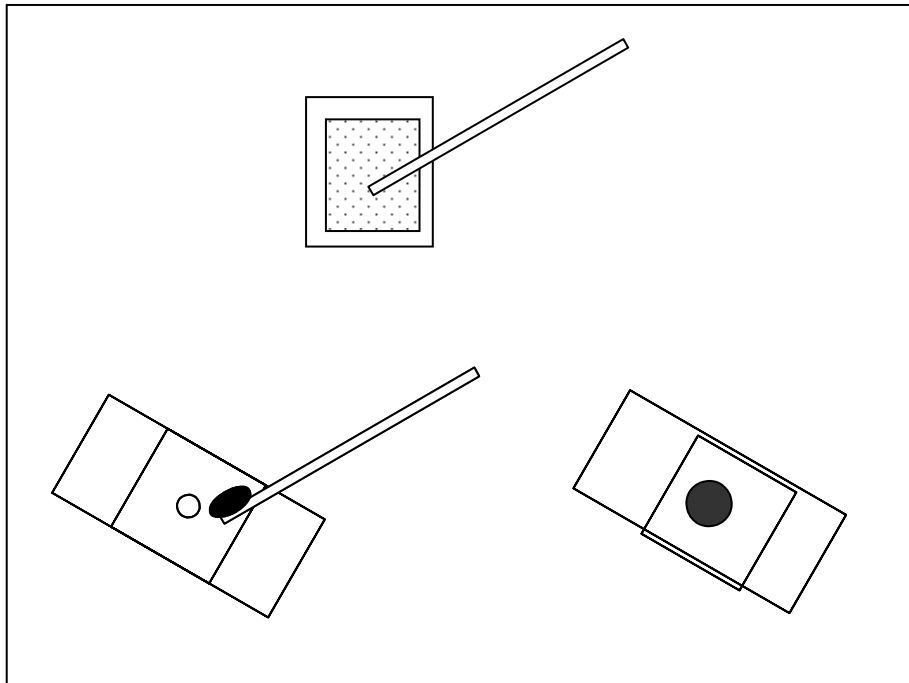


Identificação de proglotes de *Taenia*

1. Colocar o proglote a ser identificado em água por 24h a 4° C.
2. Colocar o proglote a ser identificado em pequeno recipiente contendo ácido acético glacial.
3. Decorridos pelo menos 15 minutos, retirá-lo e comprimi-lo entre duas lâminas.
4. Examinar sob iluminação intensa.

Método de Kato-Katz (quantitativo)

1. Colocar a tela sobre as fezes e pressioná-la com a espátula.
2. Colocar a placa perfurada sobre uma lamínula e depositar no orifício da placa as fezes que passaram pelas malhas da tela.
3. Comprimir as fezes no orifício da placa até que esteja completamente preenchido. Retirar a placa.
4. Colocar a "lamínula" de celofane sobre o cilindro de fezes e inverter a preparação sobre uma superfície lisa, espalhando o material uniformemente entre lâmina e a lamínula de celofane.
5. Deixar a preparação em repouso durante 60 minutos, à temperatura ambiente. Contar todos os ovos e calcular o número por gr. de fezes x 24.



Métodos de Coloração

Coloração pela hematoxilina férrica

1. Tomar uma pequena quantidade do material a examinar e fazer esfregaços não muito espessos em lamínulas. Se o material foi coletado no líquido de Schaudinn, deve ser homogeneizado, filtrado em gaze dobrada 4 vezes, centrifugado e o sedimento emulsionado com pequena quantidade de soro sanguíneo inativado, antes de ser utilizado.
2. Sem deixar secar os esfregaços, coloca-los com a face contendo o material sobre fixador de Schaudinn - 2 a 5 minutos se o material já estiver fixado e 20 minutos para os esfregaços ainda não fixados.
3. Passar os esfregaços para álcool a 50%, com a face contendo o material voltado para cima - 2 minutos.
4. Imergir os esfregaços em álcool a 70% iodado, isto é, contendo algumas gotas de tintura de iodo, de modo a adquirir uma cor de vinho do porto - 2 minutos.
5. Transferir para os álcoois a 95, 70 e 50% - 2 minutos cada um.
6. Lavá-los em água corrente - 2 minutos.
7. Coloca-los no alúmen de ferro a 2%, a frio - 5 minutos.
8. Lavá-los em água corrente - 2 minutos.
9. Colocá-los em solução aquosa de hematoxilina a 0.5%, preparada no mínimo com 48 horas de antecedência - 5 minutos.
10. Lavá-los em água corrente - 2 minutos.
11. Colocar os esfregaços em solução aquosa de ácido acético a 7% - 5 minutos.
12. Lavá-los em água corrente - 2 minutos.
13. Diferenciá-los no alúmen de ferro a 2%; quando os esfregaços adquirirem uma coloração cinzenta-azulada clara a diferenciação ter-se-á processado satisfatoriamente.

14. Lavar os esfregaços em água corrente - 5 minutos.
15. Desidratá-los nos álcoois a 70, 80 e 90%, e absoluto, permanecendo 2 minutos em cada um deles.
16. Passar os esfregaços em Xilol (2 passagens de 2 minutos cada uma) e montá-los no Bálsamo do Canadá.

Coloração tricrômica segundo Garcia & Brückner, 1988

1. Reagentes

- SAF
- Álcool etílico (C_2H_6O) a 70% (v/v)
- Corante tricrômico
- Solução de álcool etílico a 90% (v/v) acidificado com 1% de ácido acético glacial
- Álcool absoluto (C_2H_6O)
- Xilol (C_8H_{10}) ou toluol (C_7H_8)
- Resina sintética ou bálsamo do Canadá

2. Corante tricrômico

Cromotrope 2R (CI 16570)	0,6g
Light Green SF (CI 42095)	0,3g
Ácido fosfotungstico $24WO_3 \cdot 2H_3PO_4 \cdot 48H_2O$	0,7g
Ácido acético glacial $C_2H_4O_2$	1,0ml
Água destilada-deionizada	100ml

3. Colocar os componentes secos em um becker e adicionar 1 ml de ácido acético glacial. Agitar a mistura e deixar em repouso 30 min. para amadurecer. Adicionar 100 ml de água. O corante é estável e não deve ser diluído. Apresenta uma cor púrpura forte, quase preta.
4. Preparação da amostra
 - Agitar vigorosamente a mistura SAF-fezes, filtrar através de gaze dobrada quatro vezes e coletar o filtrado em tubo de centrífuga.

- Centrifugar a 500 X g por 1 minuto. Decantar o líquido sobrenadante e preparar o esfregaço com o sedimento (se necessário, ressuspender o sedimento com solução salina a 0,85%).
- Depois de seco, o esfregaço poderá ser colocado diretamente no álcool etílico a 70% por 5 min.
- Álcool etílico a 70% por 2 – 5 min.
- Corante tricrômico por 10 min.
- Álcool etílico a 90% acidificado com solução de 1% de ácido acético, por 3 seg.
- Álcool etílico absoluto por 2 – 5 min.
- Lavar
- Álcool etílico absoluto por 2 – 5 min.
- Álcool etílico absoluto por 2 – 5 min.
- Xilol por 2 – 5 min.
- Xilol por 2 – 5 min. (nesta fase o esfregaço poderá permanecer em contato com os reagentes por várias horas ou por toda a noite).
- Montagem com resina sintética ou bálsamo do Canadá.

Coloração pela safranina-azul de metileno (Baxby et al., 1984).

1. Conservar as fezes em Formol 5%.
2. Utilizar volumes de 5 µl na confecção dos esfregaços.
3. Os esfregaços devem ser secos ao ar e passados rapidamente sobre chama.
4. Posteriormente são fixados em HCl a 3% em metanol, por 3 a 5 minutos.
5. São então lavados com água, sob baixa pressão, cobertos com Safranina aquosa a 1% e aquecidos até ebulição.
6. Procede-se a nova lavagem e as lâminas devem ser cobertas com Azul de Metileno a 1% por 3 minutos.
7. Após nova lavagem, as lâminas são secas ao ar e examinadas para a visualização dos oocistos.

BIBLIOGRAFIA

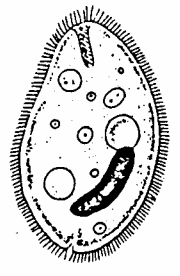
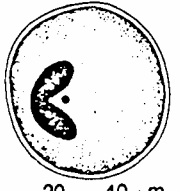
DE CARLI, G.A Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas. Métodos e técnicas. Editora Médica e Científica Ltda., R.J., Última edição.

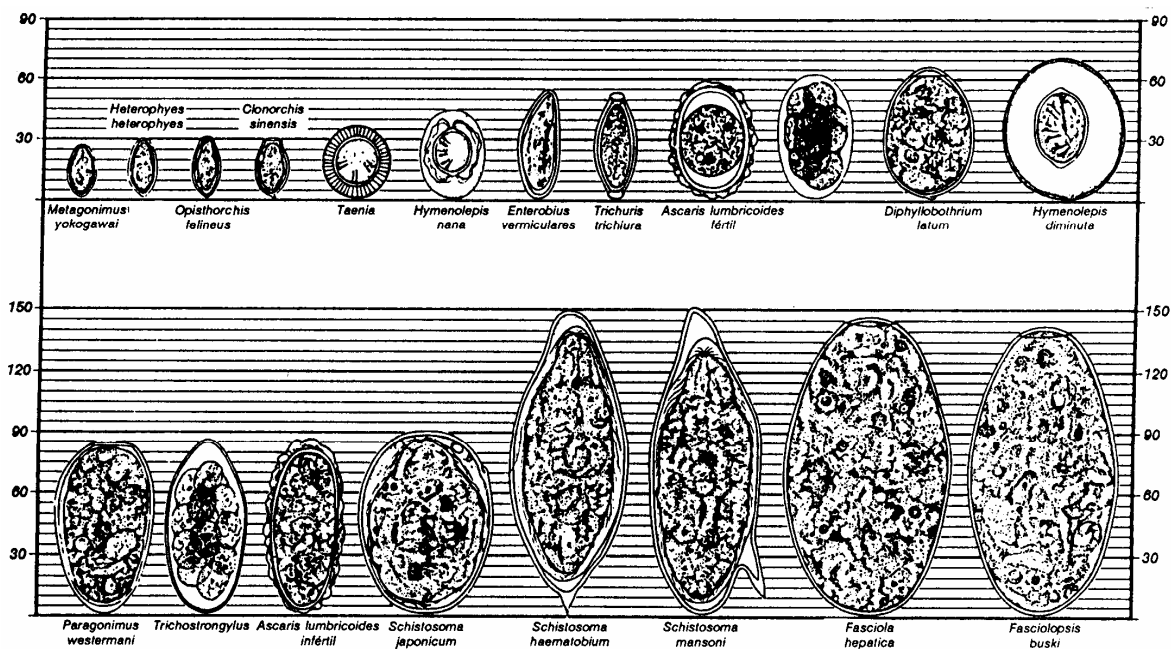
OLIVEIRA LIMA, A ; BENJAMIN SOARES, J.; GRECO, J.B.; GALIZZI, J.; ROMEU CANÇADO, J.. Métodos de laboratório aplicados à clínica. Guanabara Kogan, 1992 . Última edição.

ASH, L.R.; ORIHEL, T. Atlas of human parasitology. American Society of Clinical Pathologists. Chicago. Última edição.

APÊNDICE (DE CARLI, 1994).

ESTÁGIOS DE DIAGNÓSTICO DOS PARASITAS HUMANOS

CILIADOS		COCCÍDIOS			BLASTOCYSTIS
	<i>Balantidium coli</i>	<i>Isospora belli</i>	<i>Sarcocystis</i> spp.	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Blastocystis hominis</i>
TROFOZOÍTAS		 Oocisto imaturo	 Oocisto maduro	 Oocisto maduro	
CISTOS	 0 20 40 µm	 Oocisto maduro	 esporocisto		
		Escala: 0 10 20 30 µm			Escala: 0 10 20 µm



APÊNDICE (DE CARLI, 1994).

ESTÁGIOS DE DIAGNÓSTICO DOS PARASITAS HUMANOS

	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Entamoeba hartmanni</i>	<i>Entamoeba coli</i>	<i>Entamoeba polecki</i> ¹	<i>Endolimax nana</i>	<i>Iodamoeba bütschlii</i>	<i>Dientamoeba fragilis</i> ²
TROFOZOÍTAS							
CISTOS							Não possui a forma cística

Escala: 0 5 10 μm

	<i>Trichomonas hominis</i>	<i>Chilomastix mesnili</i>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Enteromonas hominis</i>	<i>Retortamonas intestinalis</i>
TROFOZOÍTAS					
CISTOS	Não possui a forma cística Escala: 0 5 10 μm				