
Métodos qualitativos de diagnóstico parasitológico em amostras de fezes humanas

Professora: Dra. Rosângela Maria Rodrigues

Exame Parasitológico de Fezes (EPF)

❑ Objetivos

- ✓ Diagnosticar os parasitos intestinais
- ✓ Pesquisa de diferentes formas parasitárias eliminadas nas fezes

❑ Exame Macroscópico

- ✓ Consistência das fezes, odor,
 - ✓ presença de elementos anormais- muco, sangue, vermes adultos ou parte deles
-

Exame Parasitológico de Fezes (EPF)

☐ Microscópico

- ✓ Visualização de ovos ou larvas de helmintos, cistos, trofozoítos ou oocistos de protozoários

☐ Métodos

- ✓ **Qualitativos**
 - ✓ Quantitativos
-

Métodos Qualitativos

- ✓ Demonstram a presença de formas parasitárias
- ✓ Mais utilizado
- ✓ Sem quantificar

□ ↓ formas parasitárias:

- ✓ Enriquecimento para concentrá-las
 - ✓ Quantitativos
-

Métodos Qualitativos

☐ Escolha dos métodos

- ✓ Formas parasitárias variam conforme o peso e sobrevida no meio externo;
 - ✓ Inexistência de método capaz de diagnosticar todas as formas parasitárias
 - ✓ **Métodos gerais:** permite o diagnóstico de vários parasitos
 - ✓ Métodos específicos
 - ✓ **Qualidade do EPF depende:**
 - Técnica empregada
 - Número de amostras
 - Eliminação irregular de ovos, cistos
-

Métodos Qualitativos

❑ Técnicas de concentração :

✓ Procedimento de rotina, como parte do exame parasitológico de um pequeno número de organismos que foram omitidos (exame direto a fresco).

✓ Objetivos:

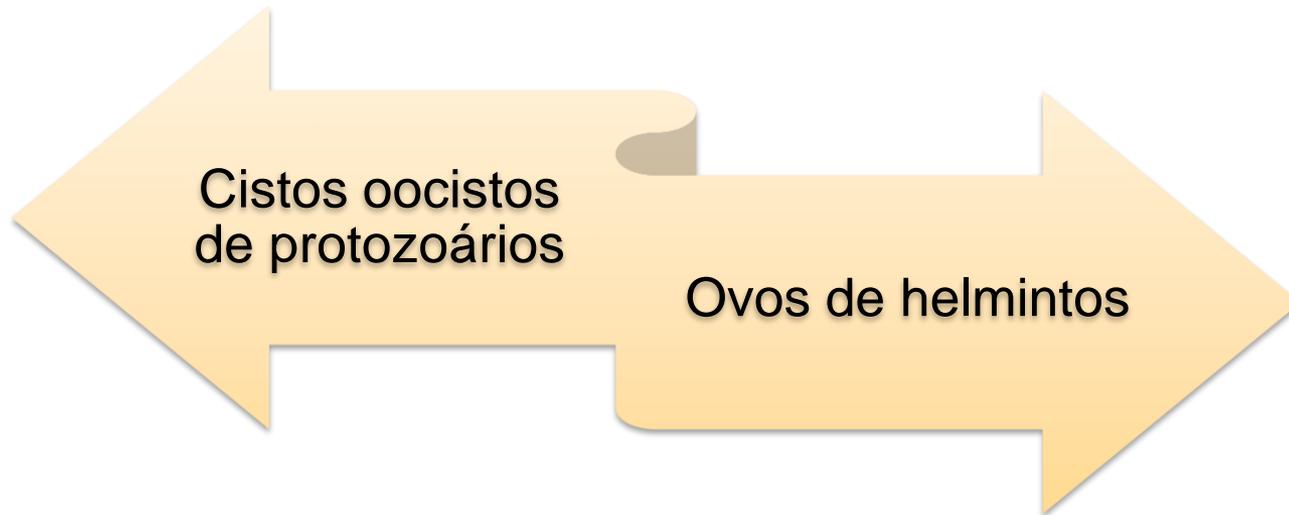
Aumentar o número de cistos, oocistos, ovos e larvas nas preparações

Eliminar a maioria dos detritos fecais

Apresentar os organismos em um estado inalterado, facilitando sua identificação

Métodos Qualitativos

Técnicas de Concentração



Flutuação

Métodos Qualitativos

❑ Métodos Principais

Flutuação
espontânea: método
de Willis

Centrífugo-
flutuação: método
de Faust

Sedimentação
espontânea: método
de Hoffman, Pons &
Janer ou Método de
Lutz

Sedimentação por
Centrifugação:
método de Blagg,
MIFC, Ritchie,
Coprotest

Baermann-Moraes e
método de Rugai

Kato Katz

Flutuação espontânea: Método de Willis

Dupla propriedade que apresenta certos ovos de helmintos de flutuarem na superfície de uma solução com densidade elevada e aderir a superfície inferior de uma lâmina

Evidenciar ovos com densidade específica baixa – ancilostomídeos, *Trichostrongylus orientalis*

Não é recomendado para pesquisa de cistos de protozoários (retraem e ficam irreconhecíveis), ovos pesados de trematódeos, ovos de *E. vermicularis* e ovos inférteis de *Ascaris lumbricoides*

Densidade específica da maioria dos ovos, cistos e oocistos é desconhecida

Conveniente uso de várias soluções com ≠ densidades específicas

Flutuação espontânea: Método de Willis

✓ Principais soluções saturadas:

- Cloreto de Sódio
- Sacarose
- Sulfato de Zinco
- Sulfato de Magnésio

Densidade: 1,18 a 1,26 g/ml

✓ Amostra - material fecal não preservado (fezes frescas)

✓ Reagente - Cloreto de Sódio (NaCl): $D = 1,20 \text{ g/ml}$

✓ Tempo de análise do material: 10 a 20 minutos

Métodos de Willis

Pesquisa de ovos leves e oocistos de protozoários



Amostra sendo depositada no frasco



Homogeneização da amostra com solução de NaCl saturada



Lamínula em contato com camada superior do líquido



Lamínula com amostra sendo conservada com a parte molhada para cima



Lamínula sendo colocada sobre o material na lâmina

Flutuação espontânea: Método de Willis

❑ Observações:

Homogeneização incompleta: ovos não flutuam na superfície do reagente

Solução saturada pode ser substituída por solução saturada de açúcar

Frascos com diâmetros menores: permite a utilização de lamínulas (dispensa a inversão)

Flutuação espontânea: Método de Willis

VANTAGENS

- Técnica simples
- Formação de uma membrana clara com ↓ detritos na superfície do tubo
- Remoção seletiva de ovos e cistos ↓ quantidades no bolo fecal
- Resulta em ↑ quantidade de organismos de certas sps quando comparado ao número de parasitos presentes em esfregaços salinos

- ↑ densidade dos reagentes → distorção na parede dos cistos
- Dificultando a sua identificação
- Gorduras e óleos presentes nas amostras fecais → dificulta a preparação e o exame do material

DESVANTAGENS

Centrífugo-flutuação: em solução de Sulfato de Zinco (Método de Faust)

Diagnóstico de cistos de protozoários e ovos leves de helmintos

Método de centrífugo-flutuação em sulfato de zinco (ZnSO_4) a 33%,

Densidade 1,18 g/mL técnica fundamenta-se

Diferença de densidade específica entre ovos de helmintos, cistos de protozoários e o material fecal

Flutuam na superfície dos reagentes com densidade específica.

Método de Faust e cols.

Pesquisa de cistos de protozoários



1
Deposição da amostra no frasco



2
Homogeneização da amostra em água destilada



3
Filtragem da amostra através da gaze



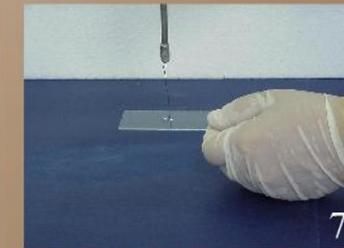
4
Amostra filtrada transferida para tubo de Wasserman e centrifugada



5
Tubo com amostra centrifugada e alça de platina sendo flambada



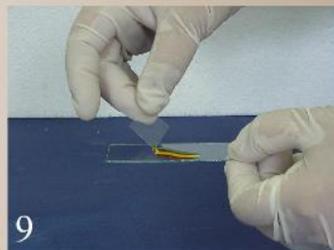
6
Alça de platina em contato com a superfície da solução



7
Transferência da solução contida na alça de platina para lâmina



8
Pingando uma gota de lugol fraco



9
Deposição da lamínula sobre a solução para análise

Centrífugo-flutuação: método de Faust

Espécimes fecais com gorduras – imprópria

Densidade específica – 1,18 g/mL

Fezes com conservantes – densidade ajustada para 1,20g/ mL -
distorção dos organismos

Exame mais completo deverão ser analisados a película e o sedimento

Examinar o material imediatamente

Solução de sulfato de zinco deforma cistos de protozoários ou ovos de helmintos com casca fina.

Técnicas de Sedimentação

❑ Procedimento de concentração pela sedimentação espontânea ou centrifugação

- ✓ Recuperação de todos os protozoários, ovos e larvas presentes
- ✓ ↑ artefatos do que as técnicas de flutuação

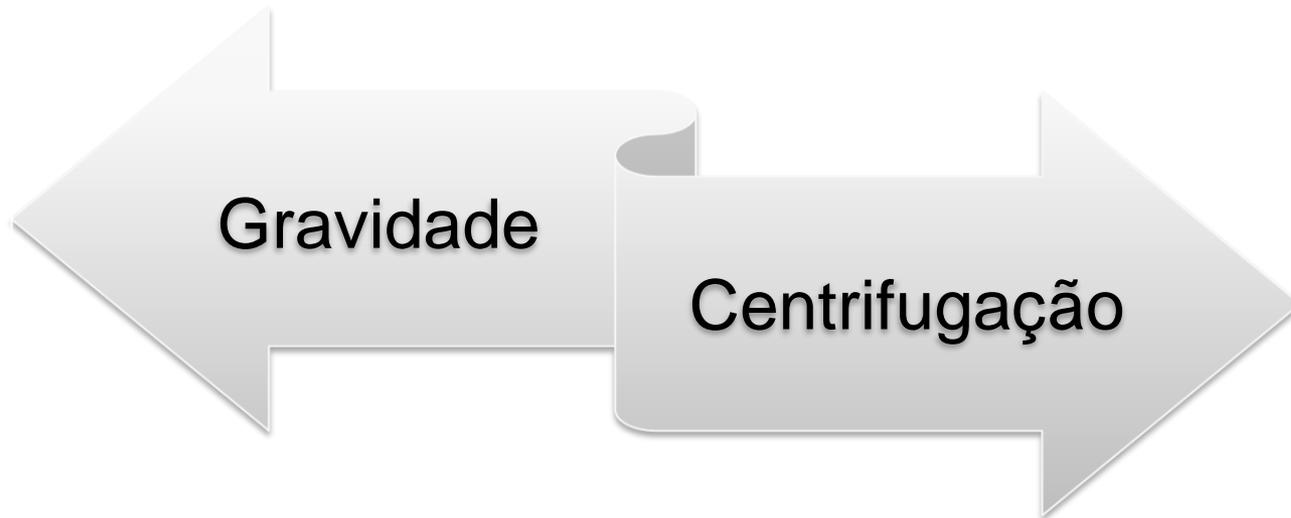
OBJETIVOS:

↑ o número de
ovos
operculados e
não operculados,
larvas e cistos de
protozoários

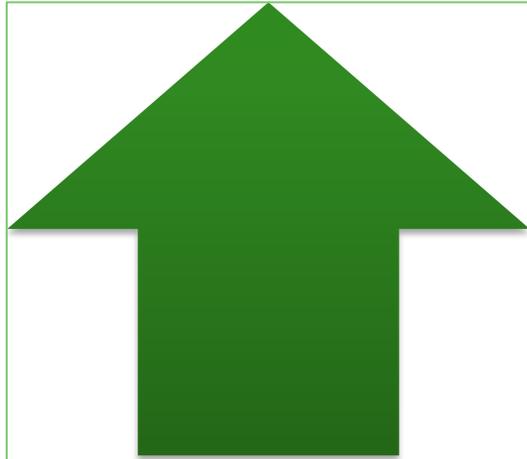
Separação de
gorduras e óleos
da maioria dos
dejetos

Técnicas de Sedimentação

- ❑ Procedimento de concentração pela sedimentação espontânea ou centrifugação



Técnicas de Sedimentação



Ação inversa da flutuação:

**Cistos, oocistos, ovos e larvas
– retidos no fundo do tubo,
dejetos são suspensos para a
superfície não interferindo no
diagnóstico final.**



**Desvantagem grande
quantidade de dejetos fecais no
sedimento, dificultando a
identificação dos organismos**

Técnicas de Sedimentação

Éter etílico

Solução de
ácido
Clorídrico

Ácido
Acético

Acetato de
Etila

Sulfato de
Sódio

Clarificar e liberar os organismos dos detritos

ÉTER

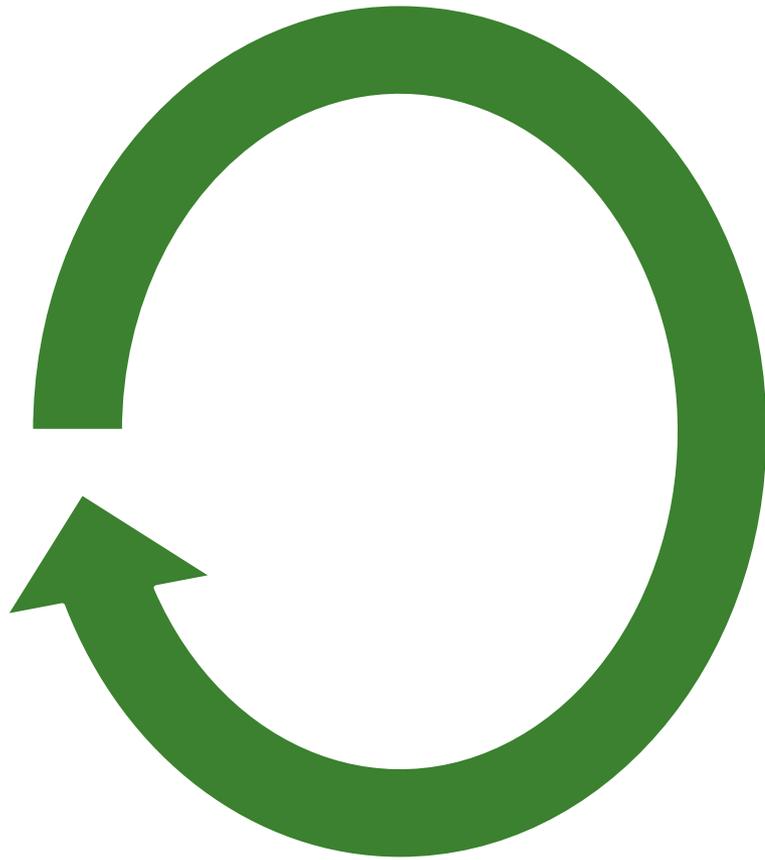
- conduz muitos ovos e cistos juntos com os detritos, dificultando o diagnóstico de infecções leves

ACETATO

- utilizado como extrator de artefatos e gorduras das fezes deixando os parasitos no fundo da suspensão.

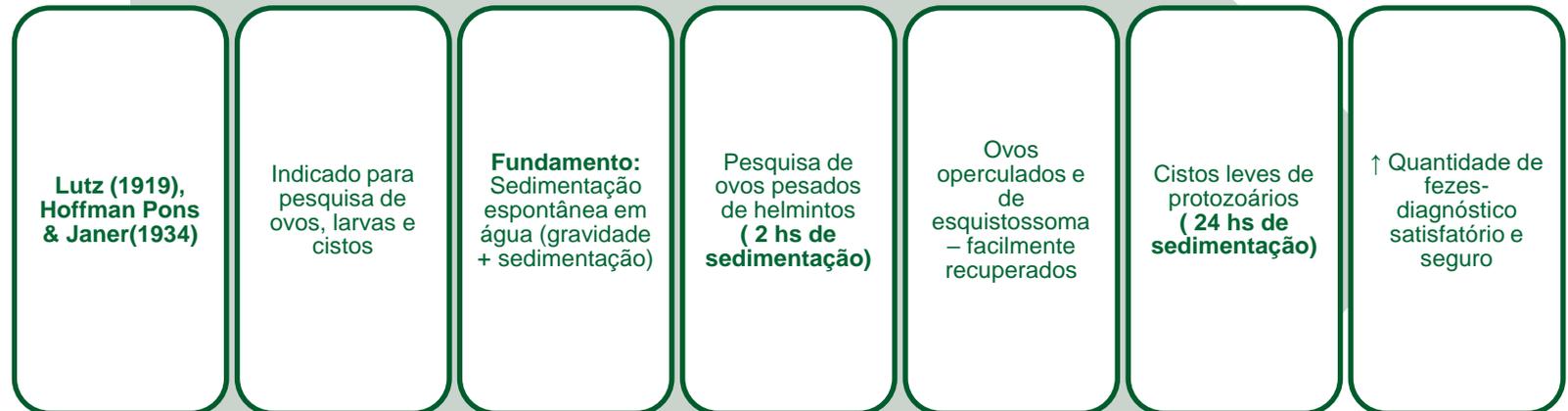
**Soluções
de ácidos
fortes**

- podem deformar ovos e cistos



Sedimentação espontânea ou método de Hoffman, Pons & Janer (HPJ) ou método de Lutz

❑ Procedimento Simples



Método de Hoffmann, Pons & Janer ou método de Lutz (Sedimentação espontânea)

Pesquisa de todas as formas dos parasitos encontradas nas fezes



Material utilizado



Amostra sendo depositada no frasco



Amostra homogeneizada ao lado do cálice com gaze dobrada



Amostra homogeneizada sendo escorrida através do palito no cálice



Amostra homogeneizada escorrida através do palito no cálice



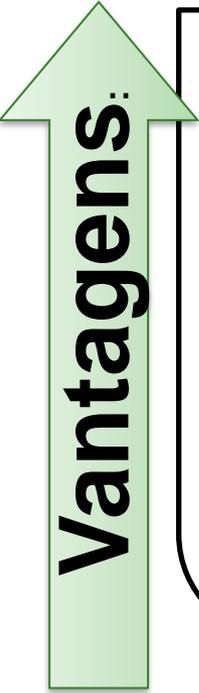
Calice contendo amostra filtrada em repouso para sedimentação



Pipeta colocando material retirado do fundo do cálice em lâmina



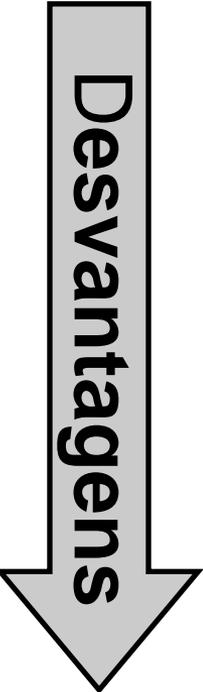
Lamínula sendo colocada sobre o material na lâmina



Vantagens:

- Baixo custo, inquéritos epidemiológicos, rotina laboratorial
- Necessidade mínima de vidraria
- Dispensável uso de reagentes e da centrifugação

- ↑ quantidade de detritos fecais no sedimento,
- Dificulta o preparo e o exame da lâminas



Desvantagens

✓ Alternativas:

- Substituir água corrente por solução aquosa de glicerina a 0,5% (v/v)
- Diminui tensão superficial e aumenta o número de organismos

Amostras: Fezes frescas com ou sem conservantes

Sedimentação por Centrifugação: Método de Blagg, MIFC, Ritchie

✓ Sedimentação das fezes por centrifugação

✓ **Fixadores:**

- Formol a 10%- Método de Ritchie
- Formol-éter ou conservante mertiolato-iodo-formaldeído MIF- Método de Blagg ou MIFC

✓ Método rápido e sensível

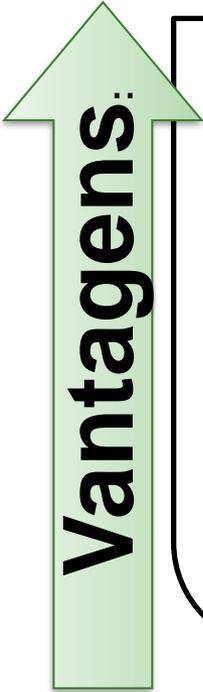
✓ Pesquisa de ovos, larvas e cistos

Sedimentação por Centrifugação: método de Blagg, MIFC, Ritchie

- ✓ pH da formalina
- ✓ Afetar o encontro de ovos e cistos no sedimento

- pH 10,0: Ovos de *Ascaris lumbricoides* e *Shchistosoma japonicum*
- pH 4,0-7,0: ancilostomídeos
- Ovos de *Trichuris trichiura* e cistos de protozoários- parece não sofrer influência do pH (pH 7,0 melhores resultados)

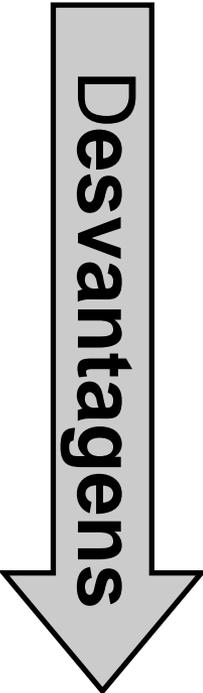
- ✓ Formalina pH neutro mais eficiente do que a tamponada
- ✓ Espessura da gaze: reter muco (oocistos *Cryptosporidium*, *Cyclospora* e esporos de microsporídios)



Vantagens:

- Além de fixador, é corante;
- Fácil preparo;
- Útil em trabalhos de campo;
- Adequado para os métodos de concentração

- Inadequado para a preservação da morfologia de trofozoítos de protozoários.
- O iodeto interfere com outros métodos de coloração;
- O iodeto pode causar distorção em protozoários.



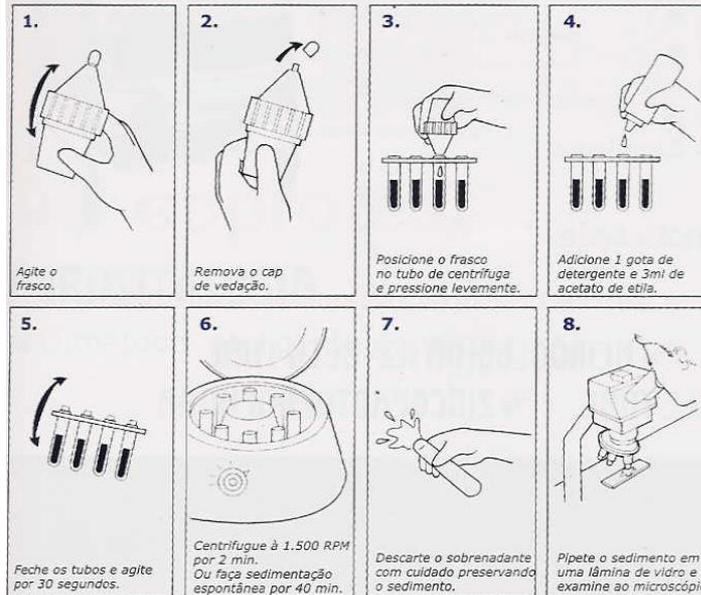
Desvantagens

coprotest[®]



Um produto com a Qualidade

NL COMÉRCIO EXTERIOR



- ✓ Variação do método de sedimentação por centrifugação;
- ✓ Recipiente (formol a 10%)



- Evidenciar ↑ formas parasitárias
- 1 exame – 3 amostras fecais em dias alternados, unificados em uma única filtragem por centrifugação
- Abrange todas as técnicas para helmintos e protozoários



Tubos Coletores - Usuário



Tubo de Centrifugação



Kit Paciente

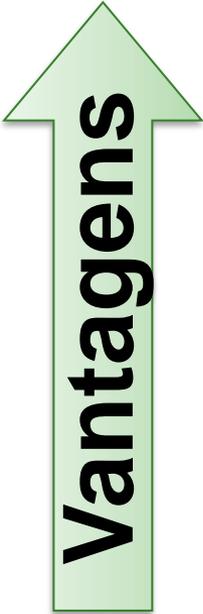
Selecione o treinamento que deseja fazer clicando em uma opção ao lado

Método de Baermann-Moraes

- ✓ Métodos de concentração
- ✓ Hidro e termotropismo positivo das larvas de nematóides
- ✓ Migram para água a 45 °C
- ✓ Gravidade depositam-se no fundo do funil
- ✓ **Finalidade**

- Pesquisa de larvas de *Strongyloides stercoralis* e ancilostomídeos

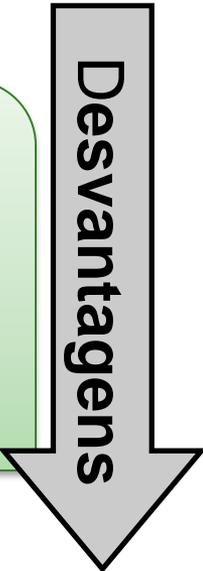
- ✓ **Amostra:**
 - Fezes frescas
 - Fezes sob refrigeração (não é recomendada)



Vantagens

- Técnica simples
- Rápida execução

- Risco de contaminação
- Uso de fezes frescas sem conservante



Desvantagens

Método de Baemann-Moraes



Método de Rugai, Mattos e Brisola

- ✓ Método de concentração
- ✓ Hidro e termotropismo positivo das larvas de nematoides
- ✓ Migram para água a 45 °C

- ✓ **Vantagem:**

- Técnica simples
- Rápida execução

- ✓ **Desvantagem:**

- Risco de contaminação
- Uso de fezes frescas sem conservante



Método de Rugai

Pesquisa de Larvas de nematódios (Hidro e termotropismo de larvas)



1
Material utilizado
"coletor sobre a gaze"



2
Extremidades da gaze sobre o
coletor repuxadas e amarradas



3
Coletor embocado no cálice de
sedimentação até entrar em
contato com a água



4
Pipeta colocando material
retirado do fundo do cálice em
lâmina

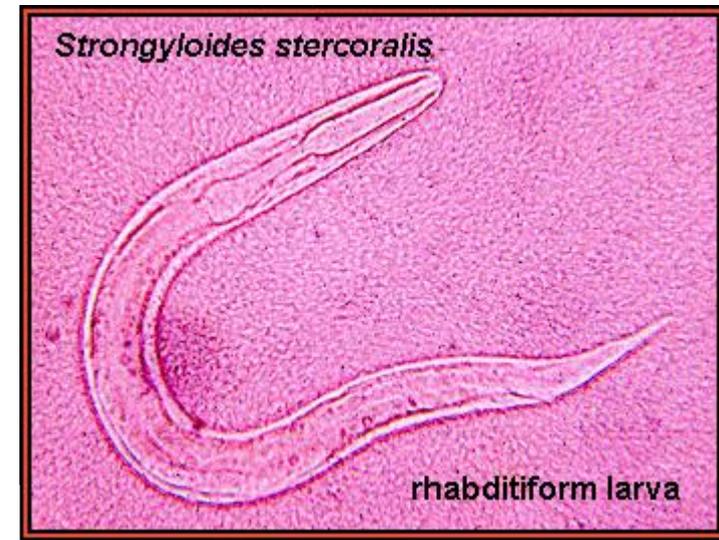
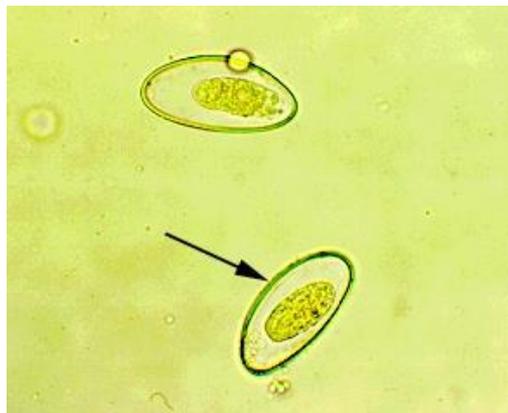


5
Lamínula sendo colocada
sobre o material na lâmina

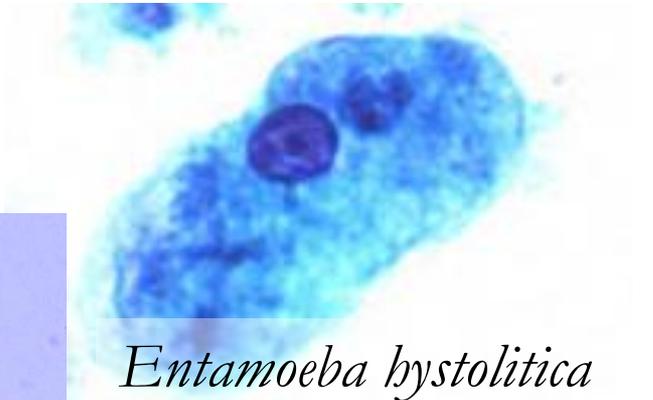
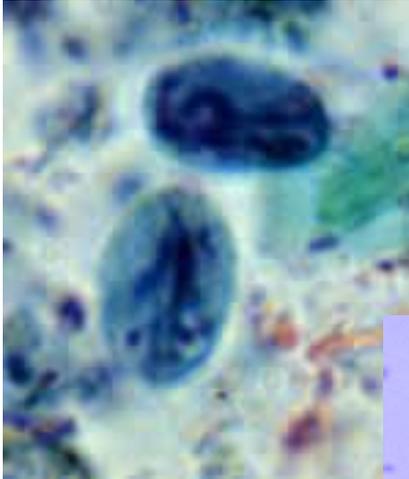
Os estágios usuais de diagnóstico são ovos e larvas de helmintos e os cistos, trofozoítos e oocistos dos protozoários.



Ovos e Larvas de helmintos



Cistos e Trofozoítos de Protozoários



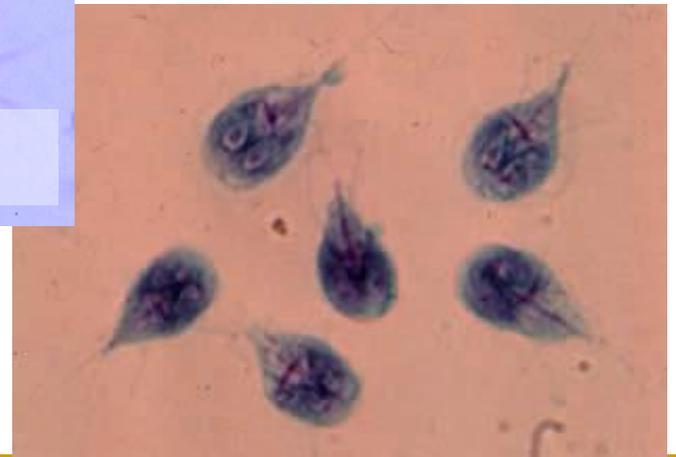
Entamoeba histolytica



Giardia lamblia



Entamoeba histolytica





Cryptosporidium

Oocistos



Toxoplasma gondii



Eimeria

Principais Protistas entéricos “amebas”



Entamoeba histolytica

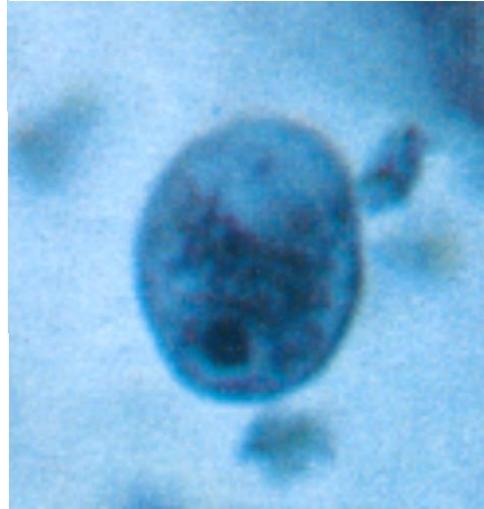


Entamoeba coli

Amebas comensais

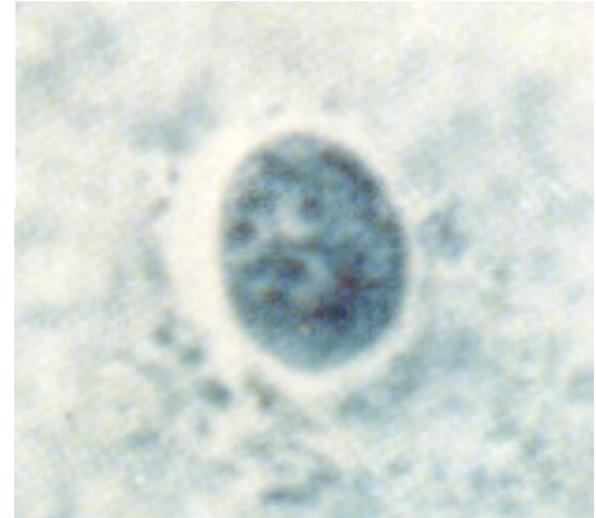


Iodamoeba büttchlii



Trofozoíto

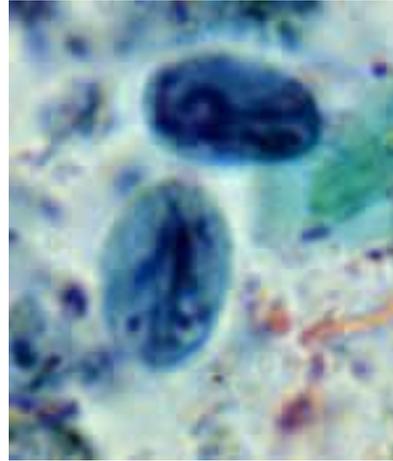
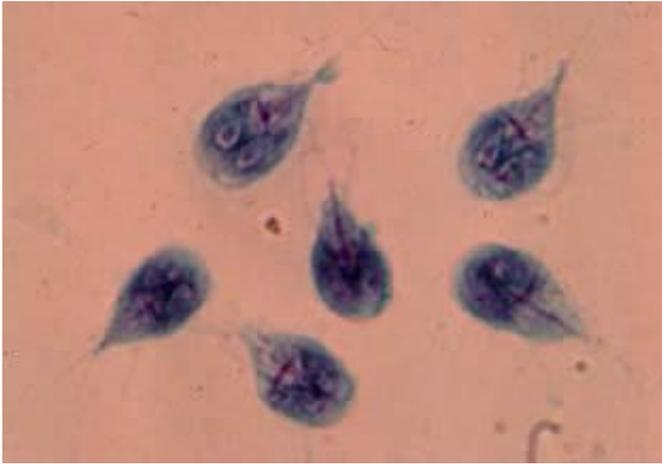
Endolimax nana



Cisto

Giardia

Trofozoítos

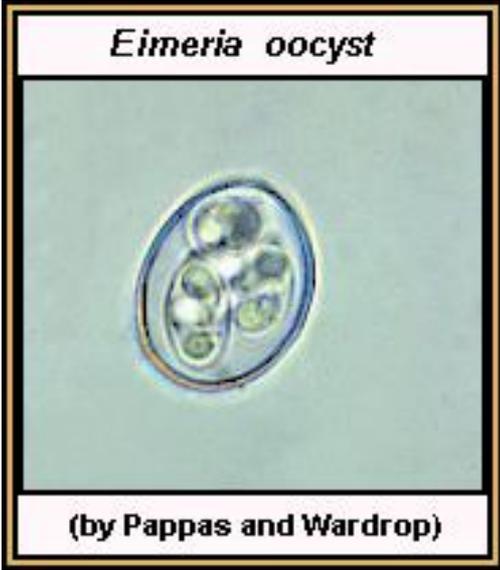


Cistos

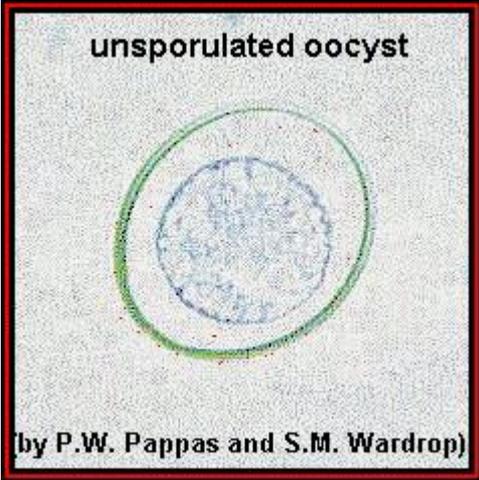
Oocistos



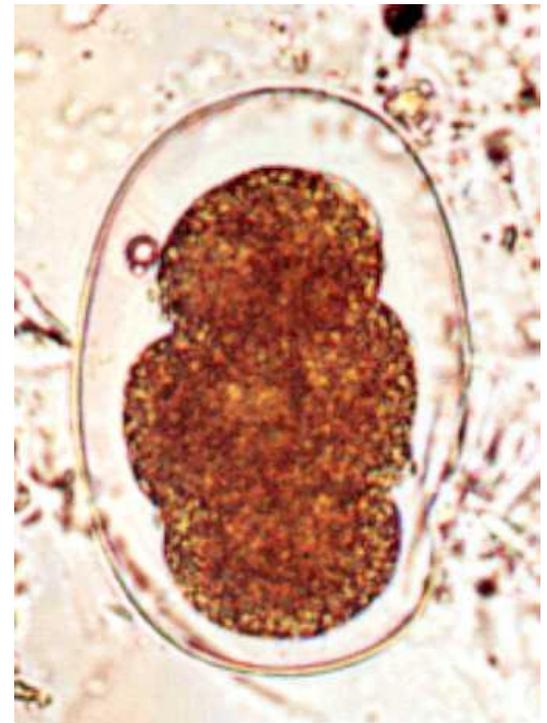
Cystoisospora belli oocyst



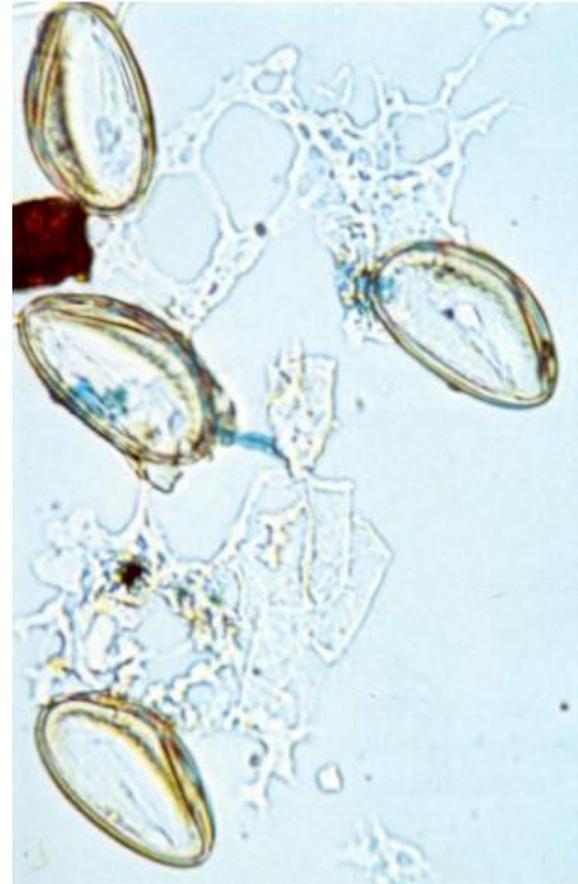
Cyclospora



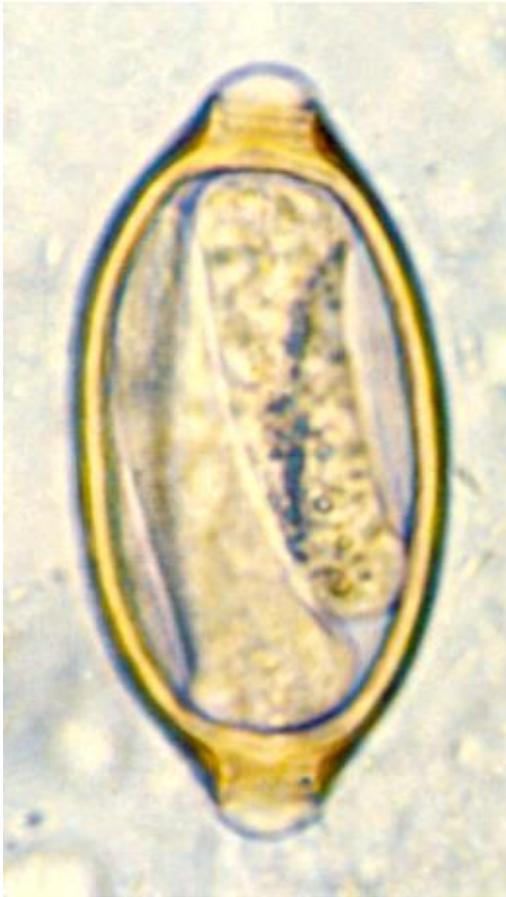
Ancilostomatidae (*Ancylostoma* e *Necator*)



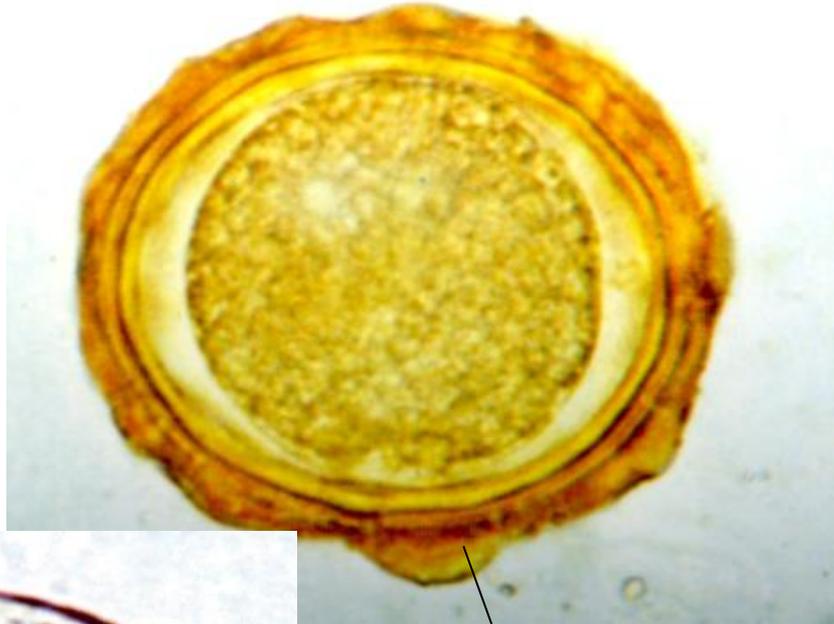
Enterobius vermicularis



Trichuris trichiura



Ascaris lumbricoides



Camada
mamilonada

Ovo
decorticado

Ovo
Infértil

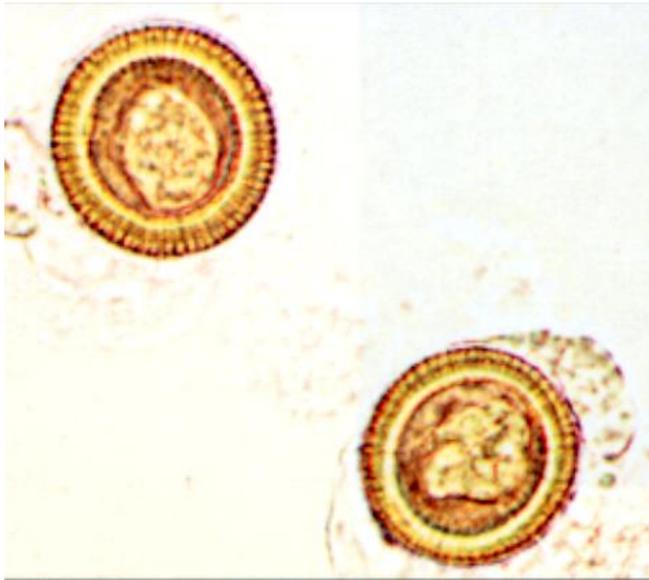
Schistosoma mansoni



Fasciola hepatica



Taenia sp



Hymenolepis



MENEZES et al., 2012

- **Sensibilidade de métodos parasitológicos para diagnóstico das enteroparasitoses em Macapá – Amapá, Brasil**
- Comparar a sensibilidade especificidade de técnicas de diagnóstico parasitológico
 - Métodos a fresco – (direto e direto com uso de lugol)
 - Hoffmann
 - Centrifugação com formalina acetato de etila
 - Métodos de Willis

634 amostras analisadas

Tabela 1 – Resultados das amostras analisadas pelo método Direto a fresco

Método Direto a fresco	n	%	p-valor
Amostras positivas	258	40,7	<0.0001*
Amostras negativas	376	59,3	<0.0001*
Protozoários	230	36,3	<0.0001*
Helmintos	21	3,3	<0.0001*
Protozoários e helmintos	7	1,1	<0.0001*

Fonte: Instrumento de coleta de dados da pesquisa.

* p-valor <0.05 (Teste qui-quadrado).

Tabela 3 – Resultados das amostras analisadas pelo método direto com uso do lugol

Método de Hoffman, Pons e Janer	n	%	p-valor
Amostras positivas	465	73,3	<0.0001*
Amostras negativas	169	26,7	<0.0001*
Protozoários	327	51,6	<0.0001*
Helmintos	89	14	<0.0001*
Associação de protozoários e helmintos	49	7,7	<0.0001*

Fonte: Instrumento de coleta de dados da pesquisa.

* p-valor <0.05 (Teste qui-quadrado).

Tabela 5 – Resultados das amostras analisadas pelo método de Willis.

Método de Willis	n	%	p-valor
Amostras positivas	300	47,3	<0.0001*
Amostras negativas	334	52,7	<0.0001*
Protozoários	191	30,1	<0.0001*
Helmintos	94	14,8	<0.0001*
Protozoários e helmintos	15	2,4	<0.0001*

Fonte: Instrumento de coleta de dados da pesquisa.

* p-valor <0.05 (Teste qui-quadrado).

Tabela 2 – Resultados das amostras analisadas pelo método direto com uso do lugol

Método Direto com uso do lugol	n	%	p-valor
Amostras positivas	439	69,2	<0.0001*
Amostras negativas	195	30,8	<0.0001*
Protozoários	357	56,3	<0.0001*
Helmintos	51	8	<0.0001*
Protozoários e helmintos	31	4,9	<0.0001*

Fonte: Instrumento de coleta de dados da pesquisa.

* p-valor <0.05 (Teste qui-quadrado).

Tabela 4 – Resultados das amostras analisadas pelo método de sedimentação por centrifugação pela Formalina-Acetato de Etila (FAE).

Método de centrifugação (FAE)	n	%	p-valor
Amostras positivas	482	76	<0.0001*
Amostras negativas	152	24	<0.0001*
Protozoários	339	53,5	<0.0001*
Helmintos	92	14,5	<0.0001*
Protozoários e helmintos	51	8	<0.0001*

Fonte: Instrumento de coleta de dados da pesquisa.

* p-valor <0.05 (Teste qui-quadrado).

MENEZES et al., 2012

- Emprego de vários métodos não é comum – análises clínicas –dificulta o diagnóstico parasitológico
- Utilização de um método – viés
- Positividade foi maior quando submetido aos cinco métodos
- Metodologias de cada método (boa a ótima reprodutibilidade)
- Recomendado a utilização de pelo menos dois métodos de ótima reprodutibilidade e com duas ou mais amostras fecais
- Aumentar a acurácia do diagnóstico parasitológico.

Métodos quantitativos de diagnóstico parasitológico em amostras de fezes humanas

Método quantitativo de ovos nas fezes

Objetivo

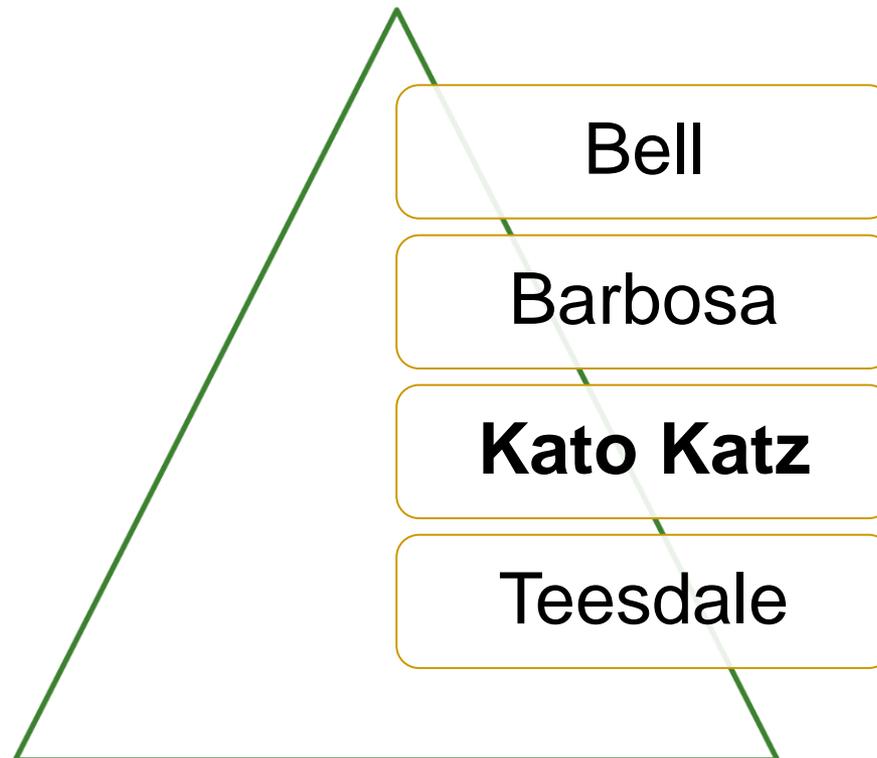
- ✓ Determinar a intensidade da infecção
- ✓ Decidir pela medicação
- ✓ Avaliar a eficácia do tratamento

Métodos Quantitativo

- ✓ Ovos por grama de fezes (OPG)
- ✓ Índice de densidade dos ovos nas fezes
- ✓ Ovos por dia (OPD) – $OPG \times \text{peso total (g) do material fecal de 24 horas}$
- ✓ Ovos por dia por fêmea (OPDPF) – $OPD / n^0 \text{ fêmeas albergadas no hospedeiro}$

Métodos coprológicos quantitativos específicos para diagnóstico do *Schistosoma mansoni*

Métodos mais utilizados:



Métodos de Kato-Katz



Métodos de Kato-Katz

Método

- ✓ Material fecal não preservado

Reagentes

- ✓ Verde de malaquita a 3% (m/v) 1 mL
- ✓ Fenol fundido 100 mL
- ✓ Glicerina 100 mL

Material

- ✓ Lamínula de celofane molhável
- ✓ Lâmina comum de microscópio
- ✓ Tela de metal (60 ou 80 malhas) ou de náilon (105 malhas)
- ✓ Cartão retangular (3 cm x 4 cm x 1,37 mm) com orifício central
- ✓ Palito e papel absorvente

Método de Kato modificado por Katz e cols.



Pesquisa de ovos de helmintos, especialmente do *Schistosoma mansoni*



1

Material utilizado



2

Deposição da amostra sobre o papel



3

Amostra filtrada com telinha de metal



4

Amostra filtrada depositada dentro do círculo central sobre a lâmina



5

Retirada da placa após deposição do material



6

Lâminula de celofane preparada em verde malaquita



7

Deposição da lâminula de celofane preparada em verde malaquita sobre a amostra



8

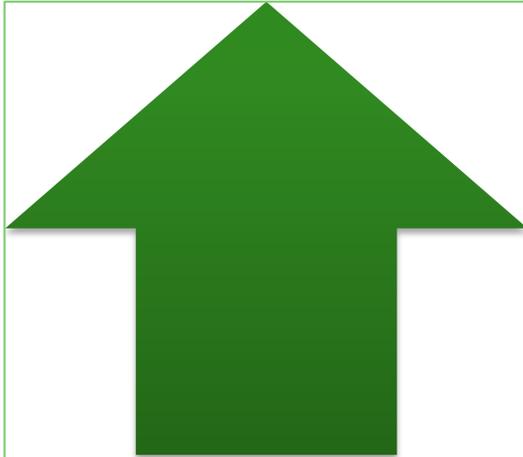
Lâminula pressionada sobre um papel absorvente

Métodos de Kato-Katz

Cálculo

- ✓ N^o de ovos presentes no material fecal (lâmina) x pelo fator 23 ou 24
- ✓ Resulta, aproximadamente no número total de ovos por grama de fezes (OPG)

ovos por grama de fezes (OPG)



VANTAGENS

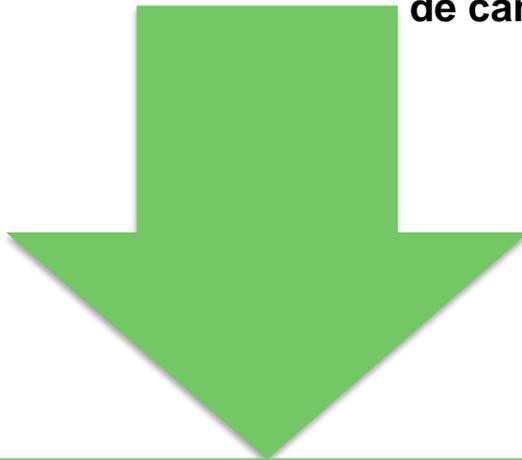
Técnica simples e sensível

Uso de pequena porção de fezes

Não exige métodos de concentração

Permite que a lâmina seja estocada para leitura posterior

Facilitando assim o emprego em trabalho de campo



DESVANTAGENS

Não é recomendado o uso de fezes diarreicas e nem preservadas

Não é indicada para diagnosticar larvas de helmintos e cistos de protozoários

Pickcells - microscópio automatizado que usa inteligência artificial



A Pickcells : plataforma baseada em visão computacional, viabilizando pesquisas e possibilitando um diagnóstico automatizado, mais rápido, preciso e eficiente de doenças infecciosas, em tempo real e com baixo custo.

Kato-Katz e Hoffman-Pons-Janer.



microscópio
automatizado
analisa a
amostra



inteligência
artificial
identifica as
estruturas



resultado é
disponibilizado
em PDF via
plataforma
web

Resultado

Objeto detectado	Contagem
<i>Hymenolepis nana</i>	13
<i>Ascaris lumbricoides</i>	21

Contagem total: 33

100% das imagens recebidas foram processadas

Imagem 1 de 72 processadas