

MINISTÉRIO DA SAÚDE

**Manual de Diagnóstico
dos Agentes Oportunistas:
Parasitos Intestinais
e *Pneumocystis Jirovecii***

Brasília – DF
2012

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Vigilância em Saúde
Departamento de Apoio à Gestão de Vigilância em Saúde

Manual de Diagnóstico dos Agentes Oportunistas: Parasitas Intestinais e *Pneumocystis Jirovecii*

Série A. Normas e Manuais Técnicos

Brasília – DF
2012

© 2012 Ministério da Saúde.

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial. A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens dessa obra é da área técnica. A coleção institucional do Ministério da Saúde pode ser acessada, na íntegra, na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde: <http://www.saude.gov.br/bvs>

Tiragem: 1ª edição – 2012 – 500 exemplares

Elaboração, distribuição e informações

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Vigilância em Saúde
Departamento de Apoio à Gestão de Vigilância em Saúde
Coordenação-Geral de Laboratórios de Saúde Pública
SCS Quadra 4, Bloco A Lote 67/97
Edifício Principal, 3º andar
CEP 70.304-000 – Brasília - DF
E-mail: svs@saude.gov.br
Home page: www.saude.gov.br/svs

Equipe Técnica

Elaboração:
Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública

Coordenação

Aline Kelen Vesely Reis – Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública – Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde [aline.reis@saude.gov.br] [akvesely@gmail.com]

Conteúdo e Revisão Técnica

Fernando Campos Sodré – Departamento de Patologia da Universidade Federal Fluminense – Niterói-RJ [mptsodre@vm.uff.br] [fcsodre52@oi.com.br]
Marco Túlio Garcia Zapata – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás [zapata@iptsp.ufg.br] [mctulianresearch@gmail.com]

Pedro Luiz Silva Pinto – Instituto Adolfo Lutz – São Paulo – Laboratório Central – Núcleo de Enteroparasitoses [plspinto@bol.com.br] [pedro.l Luiz44@terra.com.br]

Equipe de colaboradores

Mauro Maciel Arruda – CGLAB
Celma Maria da Silva Quadros – Instituto Adolfo Lutz
Ana Lúcia Bradaschia – Instituto Adolfo Lutz
Aparecida Regina Pereira Moura – Instituto Adolfo Lutz
Edson Sidião Souza Jr – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG
Ricardo Sousa Manzi – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG
Marcos Saraiva – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG
Terezinha de Jesus Carvalho Tabosa – Laboratório Central de Saúde Pública do estado de Pernambuco Dr. Milton Bezerra Sobral
Elcia Machado Cavalcanti Cauás – Laboratório Central de Saúde Pública do estado de Pernambuco Dr. Milton Bezerra Sobral

Produção Editorial

Capa: NJOBS Comunicação (Andrey Tomimatsu)
Projeto Gráfico: NJOBS Comunicação (Andrey Tomimatsu)
Diagramação: NJOBS Comunicação (Marília Assis)
Revisão: NJOBS Comunicação
Normalização: NJOBS Comunicação, Editora MS (Márcia Cristina Tomaz de Aquino)

Impresso no Brasil/Printed in Brazil

Ficha Catalográfica

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Laboratórios de Saúde Pública.
Manual de diagnóstico dos agentes oportunistas: parasitos intestinais e *Pneumocystis jirovecii* / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Laboratórios de Saúde Pública – Brasília : Ministério da Saúde, 2012.
60 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

ISBN 978-85-334-1817-2

1. Oportunista. 2. Procedimentos diagnósticos. 3. Exame laboratorial. 4. Análise parasitológica. II. Título. III. Série.

CDU 576.89:616-074

Catálogo na fonte – Coordenação-Geral de Documentação e Informação – Editora MS – OS 2012/0172

Títulos para indexação:

Em inglês: Manual of diagnosis opportunistic agents: intestinal parasites and *Pneumocystis jirovecii*.

Em espanhol: Manual para el diagnóstico de agentes oportunistas: los parásitos intestinales y *Pneumocystis jirovecii*.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	5
INTRODUÇÃO A importância das parasitoses intestinais e outros agentes oportunistas	6
CAPÍTULO 1 Biomorfologia dos agentes oportunistas	9
CAPÍTULO 2 Normas de biossegurança relativas à manipulação de amostras de material biológico e químico	13
CAPÍTULO 3 Métodos de detecção de agentes oportunistas na rotina diagnóstica	17
CAPÍTULO 4 Rotinas diagnósticas recomendadas para a detecção de agentes oportunistas em laboratórios de saúde pública	38
CAPÍTULO 5 Métodos de conservação de amostras e procedimentos para encaminhamento	42
REFERÊNCIAS	44
ANEXOS	46
ANEXO A - Fórmulas	46
ANEXO B - Medição de estruturas microscópicas	50
ANEXO C - Diagnóstico morfológico dos agentes oportunistas (guia ilustrado)	51
ANEXO D - Normas de organização e funcionamento do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública – Sislab	57
ANEXO E - Relação dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública – Lacen	58

APRESENTAÇÃO

O Sistema Único de Saúde – SUS foi concebido, no Brasil, sob a ótica de promover políticas públicas voltadas para a melhoria da prestação de serviços à população. Passados cerca de 20 anos de sua implantação e implementação, a participação dos municípios nas ações e serviços de saúde vem crescendo e se tornando cada vez mais complexa.

Com relação às ações laboratoriais, cabe à Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública – CGLAB coordenar, normatizar e supervisionar as redes de laboratórios pertencentes ao Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública, no âmbito das vigilâncias epidemiológica e ambiental.

A Portaria MS nº 2.031, de setembro de 2004, dispõe sobre a organização do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública – Sislab. Esse sistema é um conjunto de redes nacionais de laboratórios, organizadas em sub-redes, por agravos ou programas, de forma hierarquizada, por grau de complexidade das atividades relacionadas às vigilâncias.

A criação de uma rede nacional de laboratórios em saúde pública para diagnóstico das infecções por agentes oportunistas tem como metas rever e padronizar procedimentos técnicos para o fortalecimento da capacidade de resposta do sistema de saúde.

O manual de diagnóstico dos agentes oportunistas representa uma das ações da CGLAB na estruturação da sub-rede diagnóstica. Tem como objetivo apresentar e padronizar as técnicas e metodologias mais adequadas e contribuir para a atualização e capacitação de profissionais envolvidos no diagnóstico dos parasitos intestinais e do *Pneumocystis jirovecii*.

INTRODUÇÃO

A importância das parasitoses intestinais e outros agentes oportunistas

As enteroparasitoses se apresentam mundialmente de forma endêmica e, algumas vezes, de forma epidêmica, sendo responsáveis por surtos de diarreia grave tanto em países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos. A transmissão das parasitoses intestinais se processa por meio da contaminação ambiental, determinada, geralmente, pela ingestão de cistos e oocistos de protozoários e ovos de helmintos, presentes na água e em alimentos, ou por contato da pele com larvas de helmintos que contaminam o solo.

A forma de transmissão e a frequência com que as parasitoses intestinais são encontradas em determinadas regiões sofrem influências de fatores ambientais, sociais, econômicos e culturais. Dentre os fatores ambientais, destacam-se a composição e umidade do solo, temperatura ambiente e tipos de coleções de água. A superpopulação, a pobreza, o analfabetismo, a falta de saneamento básico e de educação sanitária e o próprio comportamento humano são fatores que também favorecem a transmissão. Dessa forma, a ocorrência e a importância das enteroparasitoses podem variar de acordo com o grau de desenvolvimento de cada região e de cada comunidade.

Inquéritos epidemiológicos de âmbito nacional e regional, realizados no Brasil nas últimas décadas, revelaram elevadas taxas de infecção por parasitos intestinais e expressiva variação na frequência dessas parasitoses entre as regiões federativas. Sendo assim, conclui-se que as infecções parasitárias intestinais ainda persistem como problema de saúde pública, principalmente, naquelas regiões onde a qualidade de vida é menos privilegiada.

A partir dos anos 1980, tem-se observado, na prática médica, aumento na ocorrência de *infecções por agentes oportunistas*, que são diagnosticadas com mais frequência em *pacientes imunocomprometidos*, ocasionando quadros clínicos mais graves. São considerados imunocomprometidos os pacientes que apresentam algum desequilíbrio ou anormalidade em seu sistema imunológico. As alterações da imunidade podem ter inúmeras causas, destacando-se: a imunossupressão terapêutica ou aquelas decorrentes de doenças como a *síndrome da imunodeficiência adquirida* – aids

A importância das infecções por agentes oportunistas no Brasil está relacionada, sobretudo, com o aumento do número de casos de aids e de um contingente crescente de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana – HIV/VIH, que poderão desenvolver a doença a qualquer momento, tornando-se suscetíveis a esses agentes. Entre as infecções parasitárias oportunistas mais importantes associadas à aids, destacam-se aquelas que determinam um quadro de diarreia crônica grave causadas por *Cryptosporidium* spp., *Isospora belli*, *Cyclospora cayetanensis*, Microsporídios, *Blastocystis hominis* e *Strongyloides stercoralis*. Os quadros de infecções respiratórias mais frequentes são ocasionados pelo fungo *Pneumocystis jirovecii* (*P. carinii*). Confira no quadro 1 as características biológicas gerais, os mecanismos de transmissão e as ações patogênicas mais importantes desses agentes.

Muito embora os sinais e sintomas, quando presentes, sejam indicativos de infecções oportunistas, a comprovação do agente etiológico em amostras biológicas se faz necessária para direcionar a

conduta terapêutica e/ou iniciar medidas de suporte clínico. Dessa forma, o diagnóstico laboratorial, por meio de metodologias adequadas, representa ferramenta importante para esses propósitos.

A implementação e operacionalização do diagnóstico na Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública garantirá o apoio técnico às ações do sistema de epidemiologia, vigilância e controle.

Quadro 1 - Principais agentes relacionados com infecções oportunistas no Brasil: características biológicas gerais, mecanismo de transmissão e ação patogênica

AGENTES	ASPECTOS BIOLÓGICOS	TRANSMISSÃO	PATOGENIA
PROTOZOÁRIOS			
<i>Cryptosporidium</i> spp	Desenvolvimento intracelular e extracitoplasmático nas células epiteliais intestinais; reprodução assexuada e sexuada no mesmo hospedeiro; e oocistos infectantes eliminados nas fezes	Ingestão de alimentos ou água contaminada com oocistos; contato de pessoa a pessoa; contato com animais infectados; e aspiração de oocistos por aerossóis	Destrução da mucosa causando má absorção e diarreia secretora; diarreia aguda e autolimitada em imunocompetentes; diarreia persistente em imunocomprometidos. Na aids, relaciona-se com baixos níveis de CD4
<i>Isospora belli</i>	Desenvolvimento intracelular nas células epiteliais intestinais; reprodução assexuada e sexuada no hospedeiro; e oocistos não infectantes, eliminados nas fezes	Ingestão de alimentos ou água contaminada com oocistos	Lesões celulares com atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas; diarreia com tendência à cura espontânea em imunocompetentes; e diarreia crônica, má absorção e perda de peso em imunocomprometidos
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Desenvolvimento intracelular nas células epiteliais intestinais; reprodução assexuada e sexuada no hospedeiro; e oocistos não infectantes eliminados nas fezes	Ingestão de alimentos ou água contaminada com oocistos	Lesões inflamatórias com atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas; diarreia aquosa em imunocompetentes, podendo ocorrer infecção assintomática; e diarreia persistente e com recorrência em imunocomprometidos
Microsporídios: <i>Enterocytozoon bieneusi</i> e <i>Encephalitozoon</i> intestinais, entre outras espécies	Desenvolvimento intracelular obrigatório, causando infecções intestinais ou sistêmicas; esporos com filamentos polares que propagam esporoplasmas nas células do hospedeiro; e esporos infectantes eliminados nas fezes ou na urina.	Ingestão de alimentos ou água contaminada com esporos; contato com animais infectados; e aspiração de esporos por aerossóis.	Destrução das células epiteliais intestinais infectadas; diarreia, má absorção e perda de peso são os achados mais frequentes; e ocorrência de formas disseminadas em imunocomprometidos, principalmente na aids.
<i>Blastocystis hominis</i>	Ciclo evolutivo em investigação; apresenta quatro formas evolutivas: vacuolar, granular, ameboide e cística, encontradas nas fezes ou em meios de cultura	Ingestão de alimentos ou água contaminada com cistos; o potencial zoonótico ainda é discutido	Mecanismos patogênicos específicos não esclarecidos; infecções assintomáticas e sintomáticas leves em imunocompetentes; infecções graves com quadro de colite ulcerativa e diarreia aquosa em imunocomprometidos; e relatos de infecções disseminadas

(continua)

(continuação)

AGENTES	ASPECTOS BIOLÓGICOS	TRANSMISSÃO	PATOGENIA
HELMINTO			
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Larvas que evoluem no solo penetram na pele ou mucosa; passagem pelo pulmão até a chegada ao intestino delgado; evolução para fêmea adulta partenogênica; eliminação de larvas rabditoides nas fezes; ciclo direto ou indireto no solo com a formação de larvas filarioides infectantes; possibilidade de autoinfecção	Ativa pela penetração de larvas filarioides infectantes em pele ou mucosas	Durante a migração larvária, provoca dermatites e infecções pulmonares; infecções intestinais leves ou severas, dependentes da carga parasitária, alterações anatômicas, acidez gástrica e estado imune do hospedeiro com ou sem terapêutica imunossupressora; maior gravidade na coinfeção pelo HTLV-1; e quadros graves de hiperinfecções e infecções disseminadas
FUNGO			
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Pela análise da ultraestrutura e dos dados moleculares, classificam-no como fungo; encontrado normalmente em pulmão de roedores e outros mamíferos; ciclo evolutivo em investigação; apresenta dois estágios evolutivos: trofozoito e cisto que são encontrados nos tecidos e secreções pulmonares de humanos	Pela via inalatória, desconhecendo-se, entretanto, as formas infectantes; sugere-se a transmissão direta de pessoa a pessoa	Micro-organismo de evolução extracelular, com mecanismos patogênicos desconhecidos; em pacientes imunocomprometidos causa pneumonite intersticial plasmocitária; na aids, representa uma das principais infecções oportunistas; ocorre também em crianças prematuras e desnutridas. Possibilidade de formas clínicas generalizadas

CAPÍTULO 1

Biomorfologia dos agentes oportunistas

PARASITOS OPORTUNISTAS INTESTINAIS

Agentes que liberam oocistos

Cryptosporidium spp.

Os oocistos são redondos e medem de $4\mu\text{m}$ a $6\mu\text{m}$ de diâmetro. São excretados com as fezes já esporulados, apresentando, em seu interior, quatro esporozoítos ($1\mu\text{m}$), sendo já infectante. O *Cryptosporidium* spp. pode ser pesquisado também em amostras de escarro e aspirado gástrico. Observe a seguir o desenho esquemático de um oocisto infectante.

Figura 1 - Oocisto de *Cryptosporidium* spp.

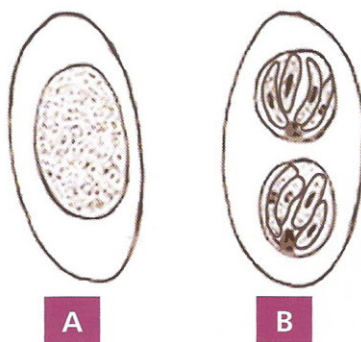


Fonte: Pinto PLS, 2010

Isospora belli

Os oocistos são elípticos e medem $30\mu\text{m}$ de comprimento por $12\mu\text{m}$ de largura. São excretados com as fezes, de forma não esporulada (oocistos imaturos), tendo no seu interior uma massa única de protoplasma denominada esporoblasto. Após 18 a 36 horas, os oocistos excretados tornam-se esporulados, resultando em dois esporocistos ($6\mu\text{m}$ a $8\mu\text{m}$) e cada um com quatro esporozoítos ($1,2\mu\text{m}$), sendo esse estágio infectante (oocistos maduros). Observe a seguir os desenhos esquemáticos de um oocisto imaturo e maduro.

Figura 2 - Oocisto imaturo de *Isospora belli* (A) e Oocisto maduro de *Isospora belli* (B)

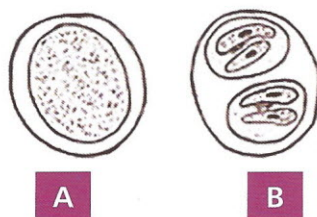


Fonte: Pinto PLS, 2010

Cyclospora cayetanensis

Os oocistos são esféricos e medem de 8µm a 10µm de diâmetro. São excretados com as fezes na forma não esporulada, tendo no seu interior uma mórula ou glóbulos refráteis (oocistos imaturos). Após duas semanas, os oocistos excretados com as fezes tornam-se esporulados, resultando em dois esporocistos ovais (4µm a 6µm) e cada esporocisto contendo dois esporozoítos (1,2µm), sendo este o estágio infectante (oocistos maduros). Observe a seguir os desenhos esquemáticos de oocistos imaturo e maduro.

Figura 3 - Oocisto imaturo de *Cyclospora cayetanensis* (A) e Oocisto maduro de *Cyclospora cayetanensis* (B)



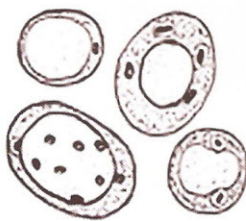
Fonte: Pinto PLS, 2010

Agentes que liberam cistos

Blastocystis hominis

Blastocystis hominis é um protozoário polimórfico, encontrado em quatro formas: vacuolar, granular amebóide e cística. A forma comumente observada é a vacuolar, vista nas fezes frescas humanas, apresenta tamanho variado (6µm a 40µm), com forma arredondada e se caracteriza por um vacúolo central grande, rodeado por múltiplos núcleos pequenos. Observe a seguir os desenhos esquemáticos dos diferentes aspectos da forma vacuolar.

Figura 4 - Formas vacuolares de *Blastocystis hominis*



Fonte: Pinto PLS, 2010

Agentes que liberam esporos

Microsporídios

Os esporos dos microsporídios que parasitam o homem têm forma ovoide e medem menos de 1µm a 3µm de diâmetro, dependendo da espécie envolvida. Análises por microscopia eletrônica de transmissão evidenciam esporos constituídos por dupla membrana: o exosporo, que é eletrodense e constituído de material proteico, e o endosporo, que é mais espesso e formado por alfaquitina,

sendo esta última responsável pela resistência do esporo no meio externo adverso. O seu interior caracteriza-se pela presença de uma estrutura patognomônica, ou seja, presença de um tubo ou filamento polar, aderido a um disco de ancoragem fixo na extremidade do esporo. No interior dos esporos são encontradas outras estruturas, tais como: núcleos, polaroplasto, plasmalema, vacúolo posterior e ribossomos. Observe a seguir o aspecto de um esporo de *Enterocytozoon bieneusi* e de *Encephalitozoon intestinalis* na microscopia eletrônica de transmissão.

Figura 5 - Microscopia Eletrônica de Transmissão



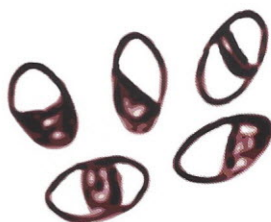
Microscopia Eletrônica de Transmissão (45.000x)
Esporoblasto de *Enterocytozoon bieneusi* com túbulo polar contendo de cinco a seis espirais em fileiras (SODRÉ et al., 1995)



Microscopia Eletrônica de Transmissão (25.000x)
Esporo de *Encephalitozoon intestinalis* com seis a sete espirais do túbulo polar em fileira única (ORENSTEIN et al., 1993)

Na microscopia óptica, a identificação dos esporos de microsporídios não é uma tarefa simples, devido à dificuldade de se corarem e pelo seu diminuto tamanho (*Enterocytozoon bieneusi* de 0.8 μ m a 1.2 μ m e *Encephalitozoon intestinalis* de 1.2 μ m a 2.0 μ m). Na análise coprológica por meio das colorações específicas, os esporos eliminados nas fezes são refráteis, com forma ovalada ou piriforme, e sem brotamento, com o seu conteúdo celular mais claro ou eventualmente mostrando uma faixa diagonal ou equatorial, referente ao tubo polar, além do vacúolo e do grânulo. Observe a seguir os desenhos esquemáticos dos diferentes aspectos dos esporos de microsporídios notados na coloração tricrômica.

Figura 6 - Esporos sugestivos de microsporídios nas fezes



Fonte: Pinto PLS, 2010

Agentes que liberam larvas

Strongyloides stercoralis

Esse verme elimina larvas vivas nas fezes. As *larvas rabditoide*s, não infectantes, são as formas evolutivas normalmente observadas. Medem aproximadamente 300µm de comprimento e se caracterizam por apresentar vestibulo bucal curto, esôfago do tipo rabditoide, dividido em corpo, istmo e bulbo. Apresenta estrutura bem visível, com aspecto de banana, localizada abaixo da metade do corpo, denominada primórdio genital. As *larvas filarioide*s, infectantes, são encontradas em fezes envelhecidas, medindo cerca de 500µm de comprimento, não apresentam vestibulo bucal nem primórdio genital. O esôfago é do tipo filarioide, reto e longo, atingindo a metade do comprimento do corpo e a cauda é bifurcada. Observe a seguir os desenhos esquemáticos das larvas rabditoide e filarioide.

Figura 7 - Larva rabditoide de *Strongyloides stercoralis* (A) larva filarioide de *Strongyloides stercoralis* (B)



Fonte: Pinto PLS, 2010

Outros agentes oportunistas não intestinais

Pneumocystis jirovecii

As formas evolutivas desse fungo, comumente encontradas nas secreções broncopulmonares, são cistos de parede grossa, embora existam também cistos de parede fina. Os cistos são arredondados e medem, aproximadamente, 5µm a 8µm, contendo até oito corpos no seu interior. Existem também formas pré-císticas esféricas medindo de 4µm a 7µm de diâmetro, não apresentando corpos em seu interior. Em pacientes imunocomprometidos, os cistos podem ser encontrados em tecidos extrapulmonares. Normalmente se apresentam agrupados, formando grumos. Observe a seguir os desenhos esquemáticos dos diferentes aspectos dos cistos e pré-cistos de *Pneumocystis jirovecii* percebidos na coloração Azul de Toluidina O.

Figura 8 - Cistos e pré-cistos de *Pneumocystis jirovecii*



Fonte: Pinto PLS, 2010

CAPÍTULO 2

Normas de biossegurança relativas à manipulação de amostras de material biológico e químico

As Normas de Biossegurança objetivam a diminuição e eventual eliminação de risco de contaminação de funcionários que tenham entre suas atribuições a manipulação de material biológico e de materiais e objetos contaminados por agentes patogênicos, além de contato físico com substâncias químicas. Para mais esclarecimentos, consultar o Manual de Biossegurança Biológica em Laboratório (OMS, 2004) e Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e de Microbiologia (BRASIL, 2006).

COLETA

A coleta, o armazenamento e a conservação das fezes e demais amostras clínicas para exame são fundamentais para a qualidade do diagnóstico. Instruções claras e precisas devem ser passadas, preferencialmente por escrito, ao paciente e ao médico solicitante. Eventualmente, alguns agentes oportunistas podem aparecer em outras amostras clínicas, tais como: escarro liquor, lavado broncoalveolar, aspirado duodenal etc.

Condições para a coleta

O recipiente para a coleta deve ter boca larga, com vedação hermética para preservar a umidade, e estar limpo e seco.

Em material fecal

É indispensável a coleta adequada de amostras fecais, para que se possa garantir a qualidade dos resultados do exame, daí serem aconselhados os seguintes pontos:

- Identificar os recipientes de modo legível, com data, nome, registro geral, número de prontuário do paciente, usando, como rótulo, etiqueta autoadesiva.
- As fezes de consistência sólida e pastosa devem ser colhidas diretamente em recipiente ou em folha de papel limpos ou plástico, sendo depois transferidas com auxílio de espátula de madeira ou outro instrumento similar para o frasco coletor. As fezes líquidas devem ser colhidas em recipiente de boca larga ou urinol. Em neonatos, colher na própria fralda, evitando o contato das fezes com a urina.
- Deve-se evitar a coleta de fezes obtidas de vaso sanitário devido ao risco de contaminação com a água e a urina.
- De preferência, colher as fezes antes da administração de quaisquer medicamentos ou substâncias químicas, tais como: antidiarreicos, antibióticos, antiácidos, derivados de bismuto e de bário, vaselina e óleos minerais.
- Pacientes que ingeriram o contraste de sulfato de bário para a realização de exame radiológico devem aguardar de sete a dez dias para coletarem as fezes. Os derivados de bário e bismuto podem interferir no resultado do exame pelo excesso de substância cristalina, que pode destruir os trofozoítos, devido à sua ação abrasiva.

- Antibióticos, como a tetraciclina, afetam a flora intestinal normal, causando diminuição ou ausência temporária dos organismos nas fezes.
- Quanto à vaselina e aos óleos minerais, os glóbulos de óleo podem interferir no exame, confundindo-se com certas estruturas parasitárias.
- Deve ser coletada uma quantidade mínima de 20g a 30g de fezes (aproximadamente a metade de um coletor de 50ml).
- Quando possível, devem ser obtidas fezes frescas, que poderão ser transportadas para o laboratório de imediato, pois são preferíveis para o exame de trofozoítos e para a pesquisa de *Blastocystis hominis* e de larvas de *Strongyloides stercoralis*.
- As fezes frescas, de teor líquido aumentado ou aquosas, quando não adicionadas a nenhum conservante, devem ser examinadas dentro de trinta minutos após a evacuação, pela possibilidade de conter trofozoítos de protozoários.
- As fezes formadas podem ser examinadas após certo espaço de tempo, mas o exame da amostra deve ser concluído, preferencialmente, no mesmo dia em que o material foi eliminado pelo paciente.
- Na impossibilidade de se realizar o exame dentro do prazo estipulado e não ser possível a conservação em fixador adequado, a amostra deve permanecer no refrigerador, entre 4°C a 8°C, até 48 horas, podendo depois ser submetida aos processos adequados de exame. Veja no capítulo *Métodos de conservação de amostras e procedimentos para encaminhamento* os meios mais indicados para a conservação de amostras.

Em outros materiais biológicos

Para a pesquisa de *Pneumocystis jirovecii* utilizam-se como material de análise o lavado broncoalveolar, o aspirado traqueal em crianças, a biópsia pulmonar e o escarro, preferencialmente, o induzido. Os três procedimentos iniciais são técnicas invasivas e devem ser realizados pela equipe médica.

O escarro induzido pode ser coletado pelo próprio paciente, desde que siga as seguintes recomendações:

- Hidratação no dia anterior à coleta e repouso sem travesseiro.
- Antes da coleta, realizar primeiramente bochecho com água abundante.
- No momento da coleta, inspirar profundamente, prendendo a respiração por alguns instantes, e soltar o ar rapidamente e com força pela boca. Repita esse procedimento pelo menos três vezes.
- Escarre diretamente no pote de coleta, no mínimo três vezes.
- É importante observar que o escarro induzido apresenta consistência viscosa, diferentemente da saliva, e deve conter cerca de 2ml a 5ml de volume.

Como o material não pode ser fixado, encaminhar ao laboratório sob refrigeração e dentro de um período não superior a 24 horas após a coleta. Não aceitar o material com tempo superior a

24 horas após a coleta devido ao risco de proliferação de outros fungos que podem conduzir ao erro diagnóstico.

ACONDICIONAMENTO, TRANSPORTE E RECEPÇÃO DO MATERIAL

- As amostras devem ser acondicionadas em recipientes vedados e identificadas no rótulo com os dados do paciente e colocadas em sacos plásticos devidamente lacrados e identificados, seguindo orientações das Normas de Biossegurança vigentes. Lembre-se: todas as amostras devem ser consideradas potencialmente infectantes.
- O transporte dos recipientes contendo os materiais deve ser realizado em caixas metálicas ou outros suportes que possam sofrer algum processo de descontaminação e/ou esterilização, ou ainda, que possam ser descartados no lixo hospitalar após sua utilização.
- As requisições formais (papeletas) utilizadas e padronizadas para os diferentes tipos de exames laboratoriais devem ser preenchidas completamente quanto às informações solicitadas.

TRATAMENTO E PROCEDIMENTO DO MATERIAL

Para garantir a qualidade dos exames laboratoriais e a segurança do técnico e da equipe responsável pelo procedimento é imprescindível que algumas regras sejam observadas:

- Manter o local de trabalho sempre limpo e em ordem.
- Antes e após a manipulação das amostras a serem processadas deve-se lavar bem as mãos.
- Descontaminar a bancada com solução de hipoclorito de sódio a 1% antes do início das atividades.
- É obrigatório o uso de avental dentro do laboratório (se possível, descartável).
- É proibido fumar, comer ou beber dentro do laboratório.
- É necessário o uso de luvas de procedimento ao lidar com material biológico.
- A utilização de máscaras de proteção é obrigatória ao se trabalhar com materiais que possam desprender partículas, aerossóis ou vapores tóxicos.
- Para este último recomenda-se também o uso de capela de segurança.
- Toda a vidraria e objetos utilizados devem ser colocados em recipientes contendo solução de hipoclorito de sódio a 2% até o momento de serem lavados e esterilizados.
- As bancadas devem ser limpas e descontaminadas com solução de hipoclorito de sódio a 2% ao final dos trabalhos.
- Os funcionários não devem sair do seu local de trabalho portando aventais e luvas utilizados em atividades desenvolvidas nas bancadas.
- Caso alíquotas do material enviado caiam na bancada ou no chão, desinfetar imediatamente o local com solução de hipoclorito de sódio a 2%, por cinco minutos.
- Não pipetar reagentes com a boca. Utilizar pipetas automáticas.

DESCARTE DO MATERIAL E DO RECIPIENTE

- O material enviado para análise e o próprio recipiente utilizado para o seu encaminhamento devem ser colocados diretamente em recipientes de parede rígida com tampa, contendo hipoclorito de sódio a 2%. Posteriormente, esse material deverá ser colocado em saco plástico identificado e enviado para autoclavagem, incineração ou para o lixo hospitalar.
- Ao término das atividades, os recipientes de vidro usados nos procedimentos poderão ser reutilizados após autoclavagem, lavagem e esterilização.

CAPÍTULO 3

Métodos de detecção de agentes oportunistas na rotina diagnóstica

PARASITOS OPORTUNISTAS INTESTINAIS

Para o diagnóstico das parasitoses oportunistas intestinais, podem ser empregados métodos da rotina do exame coprológico. Considerando a simplicidade, o custo e a especificidade desses métodos, recomendam-se para diagnóstico inicial as técnicas de concentração e colorações específicas devidamente padronizadas. As técnicas imunobiomoleculares, apesar de apresentarem elevada sensibilidade e especificidade, são úteis em casos de investigação epidemiológica na caracterização específica do agente etiológico, subsidiando as ações de vigilância e controle. A seguir, estão listados, na forma de fluxograma, os métodos e as respectivas técnicas que podem ser aplicados no diagnóstico laboratorial dos parasitos oportunistas intestinais.

Quadro 2 - Fluxograma dos métodos e respectivas técnicas diagnósticas

AMOSTRA FECAL					
Amostra in natura				Amostra com conservante	
Exame direto "a fresco"	Sedimentação espontânea, Centrifugo-flutuação e Extração de larvas	Técnica de esporulação na eventualidade de amostras +	Técnicas imunológicas e/ou moleculares (amostras conservadas a -20°C) na eventual confirmação e/ou investigação de surto	Concentração Coprológica	
				Centrifugo-extração com solventes orgânicos	
Pesquisa de trofozoítos e larvas	Cistos, oocistos e larvas	K ₂ Cr ₂ O ₇ bicromato de potássio	Pesquisa de antígenos (ELISA) e/ou PCR)	Colorações ácido-álcool resistentes: Safranina Kinyoun Auramina	Colorações tricrômicas: Chromotrope e as suas variações
<i>Cryptosporidium</i> <i>Cyclospora</i> <i>Isospora</i> <i>Strongyloides</i> <i>Blastocystis</i>	<i>Isospora</i> <i>Strongyloides</i> <i>Blastocystis</i>	<i>Cyclospora</i> <i>Isospora</i>	<i>Cryptosporidium</i> <i>Cyclospora</i> <i>Isospora</i> <i>Strongyloides</i> <i>Microsporidia</i>	Se positivo para coccídios	Se positivo para microsporídia <i>Blastocystis</i>
				Análise Morfométrica	
				Diagnóstico genérico <i>Cryptosporidium</i> <i>Cyclospora</i> <i>Isospora</i>	Esporos sugestivos de <i>Enterocytozoon</i> sp <i>Encephalitozoon</i> sp outras

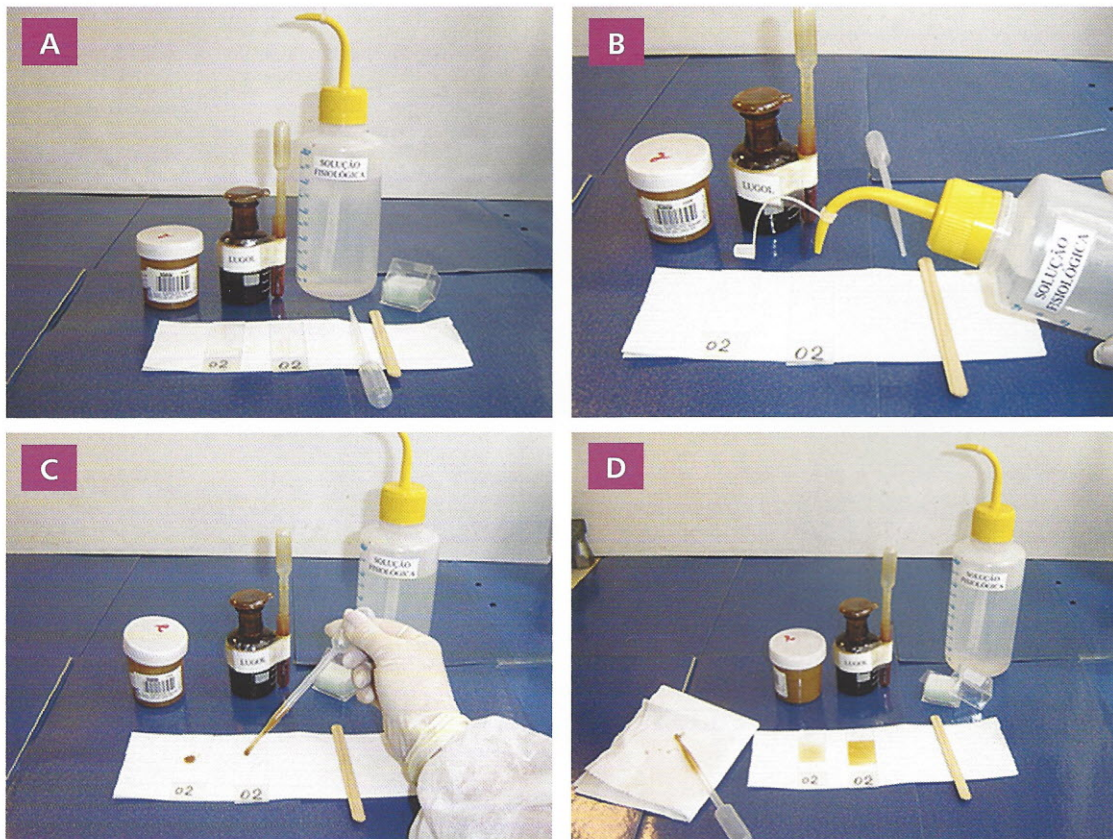
Método direto a fresco

Esse método pode ser aplicado a qualquer amostra de fezes, independentemente de sua consistência. Em fezes frescas de teor líquido aumentado ou aquosas, obtidas naturalmente ou pelo emprego de laxativos, o objetivo deverá ser a pesquisa de trofozoítos vivos. Nesse caso, o exame da amostra deverá ser realizado o mais rapidamente possível, devido à pequena sobrevivência dos trofozoítos. Eventualmente, dependendo da carga parasitária, é possível observar cistos e oocistos de protozoários, assim como ovos de helmintos e larvas vivas de *Strongyloides stercoralis*. Considerando sua baixa sensibilidade, faz-se necessária a utilização de técnicas específicas de concentração e coloração.

A técnica consiste em pesquisar formas evolutivas de parasitos, diretamente entre lâmina e lamínula. Sobre a lâmina para microscopia, colocar uma gota de solução fisiológica a 0,85%. Com o auxílio de uma espátula descartável, colocar um fragmento de fezes sobre a solução salina e homogeneizar. Cobrir essa suspensão com uma lamínula. Examinar ao microscópio óptico com objetivas de 10x e de 40x. Em caso de fezes diarréicas contendo muco e sangue, coletar uma pequena porção dessa área para exame direto. Uma preparação semelhante pode ser corada pelo Lugol. Veja a seguir as principais etapas do exame direto a fresco e após coloração pelo Lugol.

Atenção: o uso de solução fisiológica é imprescindível para o diagnóstico do *Blastocystis hominis*.

Figura 9 - Etapas principais para os exames direto, a fresco e após coloração pelo Lugol



(continua)

(continuação)

- a – Material usado no exame direto. Fazer duas lâminas por amostra
- b – Adicionar uma gota de solução fisiológica em cada lâmina
- c – Adicionar uma gota de fezes diarreicas em cada lâmina
- d – Corar com Lugol uma das lâminas, deixando a outra sem o corante (a fresco). Cobrir as duas lâminas com lamínulas

Fonte: Pinto PLS, 2010

Métodos para extração de larvas das fezes

Os métodos para extração de larvas de nematódeos nas fezes baseiam-se no termo-hidrotropismo positivo dessas formas evolutivas e, para tal, recomendam-se as técnicas de Baermann-Moraes e de Rugai e cols.

Atenção: preferencialmente, os métodos de extração de larvas são realizados em amostras frescas, de consistência normal ou pastosa. Fezes líquidas devem ser misturadas a carvão granulado lavado e esterilizado na proporção (1:3) antes de serem submetidas à análise.

Fezes armazenadas sob refrigeração, durante períodos relativamente longos, não deverão ser utilizadas.

Técnica de Baermann (1917) e Moraes (1948)

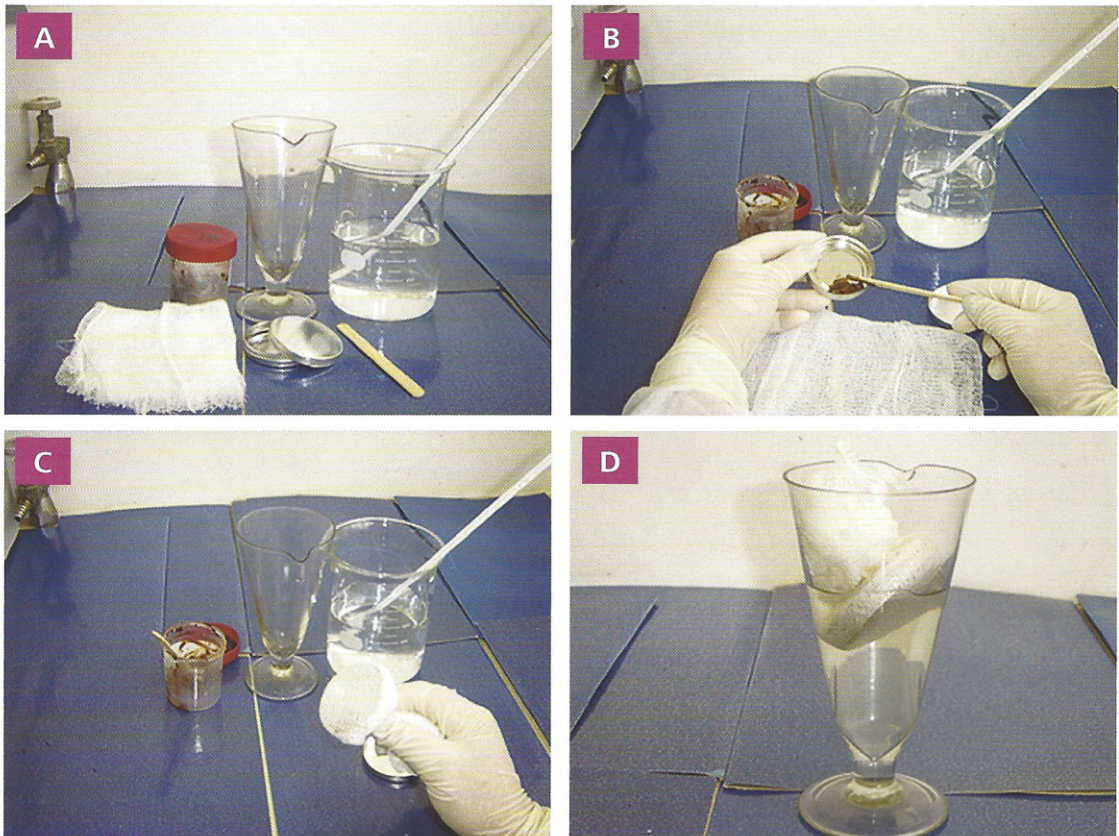
- Usar um funil de vidro de 10cm a 12cm de diâmetro, tendo a haste ligada a um tubo de látex (5cm a 10cm de comprimento) e vedado com uma pinça de Mohr.
- Colocar o funil adaptado ao tubo de látex em um suporte apropriado.
- Colocar uma tela metálica coberta com gaze cirúrgica dobrada uma a quatro vezes sobre o funil.
- Encher o funil com água à temperatura de 40°C a 42°C.
- 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 látex.
- Colocar sobre a gaze 8g a 10g de fezes de maneira que essas fiquem em contato com a água, mas não submersas.
- Deixar em repouso por 60min.
- Abrir lentamente a pinça e coletar parte do líquido em vidro de relógio.
- Deixar em repouso durante alguns minutos, pois dessa forma as larvas migrarão para o centro do vidro de relógio.
- Examinar em microscópio estereoscópico. Se houver larvas, transferi-las com pipeta Pasteur para uma lâmina, pingar uma gota de Lugol e observar ao microscópio óptico com objetiva de 40x.
- Pode-se também proceder da seguinte forma: coletar o sedimento em tubo cônico e centrifugar durante um minuto, examinar o sedimento entre lâmina e lamínula. Para identificar as características morfológicas das larvas, corar a preparação com solução de Lugol e examinar ao microscópio óptico com objetivas de 10x e 40x.

Técnica de Rugai, Mattos e Brisola (1954)

- Colocar 8g a 10g de fezes frescas em uma gaze dobrada em quatro e fazer uma pequena trouxa.
- Colocar essa trouxa em um cálice de sedimentação de 125ml, fixando-a na parte interna do cálice com o auxílio de cliques de metal grande ou pregador de roupa. Pode ser usada latinha ou a própria tampa do coletor envolvida em gaze como suporte para as fezes.
- Adicionar água morna (40°C – 45°C) até entrar em contato com as fezes.
- Deixar em repouso por uma hora, de preferência em ambiente escuro.
- Colher o sedimento no fundo do cálice de sedimentação com pipeta Pasteur e proceder à pesquisa e identificação das larvas, como descrito no método de Baermann-Moraes.

Observe a seguir as etapas principais do método de extração de larvas de Rugai, Mattos & Brisola (1954)

Figura 10 - Etapas principais do método de extração de larvas de Rugai, Mattos & Brisola (1954)



- a – Material utilizado no método
b – Colocar as fezes na gaze ou em uma latinha
c – Montar uma trouxa
d – Fixar na parte interna do cálice e completar com água a 40°C – 45°C

Fonte: Pinto PLS, 2010

Métodos de concentração

Existem dois métodos de concentração: a) qualitativos – acusam a presença de parasitos sem quantificá-los; b) quantitativos – permitem a contagem dos ovos nas fezes e indicam a provável quantidade de vermes. Estes últimos não são aplicados ao diagnóstico dos parasitos oportunistas intestinais.

Método qualitativo por centrífugo-flutuação (Técnica de Faust)

Esse método baseia-se na centrífugo-flutuação de cistos e oocistos de protozoários, de ovos e larvas de helmintos, em uma solução de sulfato de zinco, cuja densidade é de 1,180 (+33g%). Os ovos pesados de trematódeos (*Schistosoma mansoni* e *Fasciola hepatica*), de cestoides e ovos inférteis de *Ascaris lumbricoides* não são concentrados por esse método.

- Misturar 1g a 2g de fezes coletadas de várias partes do bolo fecal com 10ml de água filtrada.
- Filtrar em gaze dobrada quatro vezes, em funil, recolhendo o filtrado em tubo de Wassermann, medindo 13mm de diâmetro por 10cm de comprimento ou similares.
- Adicionar água corrente até completar dois terços da capacidade do tubo.
- Centrifugar durante 45 a 60 segundos a 2.500 rotações por minuto.
- Decantar o líquido sobrenadante e adicionar 1ml a 2ml de água filtrada ao sedimento antes de ressuspendê-lo.
- Completar, com água filtrada, dois terços do volume e agitar.
- Centrifugar novamente.
- Decantar e continuar lavando até que o líquido sobrenadante esteja límpido. Geralmente, três lavagens são suficientes.
- Adicionar ao sedimento 2ml a 3ml de sulfato de zinco em solução a 33%, com densidade de 1,18 g/ml (ver preparação no Anexo I). Misturar bem e acrescentar o restante da solução até 0,5cm da borda do tubo (aproximadamente 10ml).
- Recentrifugar a 2.500 rpm durante um minuto.
- Colher o material da película que se forma na superfície do sobrenadante com alça de platina e colocar em lâmina. Esse procedimento deve ser repetido por duas a quatro vezes para colher a maior quantidade possível de material a examinar.
- Colocar uma gota de Lugol e cobrir com lamínula.
- Examinar ao microscópio óptico com aumentos de 100x e 400x.

Método qualitativo por centrífugo-flutuação (Técnica de Sheather)

Esse método baseia-se na centrífugo-flutuação para a pesquisa de oocistos e cistos de protozoários, em uma solução saturada de açúcar, cuja densidade é de 1,200g/ml. É indicado, principalmente, para a detecção de oocistos de *Isospora belli*.

Nesse método, não são usados solução fisiológica nem Lugol no preparo das lâminas.

No caso de fezes formadas:

- Transferir cerca de 0,5g para um tubo Falcon com tampa e capacidade para 15ml.
- Adicionar solução saturada de açúcar até a metade do tubo.
- Homogeneizar, invertendo o tubo várias vezes.
- Adicionar solução de açúcar até que se complete totalmente o volume do tubo e forme um menisco positivo.
- Aguardar 30 minutos.
- Encostar uma lamínula na superfície do líquido.
- Montar a preparação em uma lâmina.
- Examinar ao microscópio óptico com aumentos de 100x e 400x.

No caso de fezes líquidas:

- Centrifugar o material fecal em solução fisiológica ou água destilada (650g) por cinco minutos.
- Misturar + 1ml do sedimento com a solução saturada de açúcar.
- Centrifugar a suspensão fecal com a solução saturada de açúcar (400g) por cinco a dez minutos.
- Coletar com o auxílio de uma alça de platina ou ponteira de 5µl a 10µl a porção mais superficial da preparação.
- Montar a preparação em uma lâmina.
- Examinar ao microscópio óptico com aumentos de 100x e 400x.

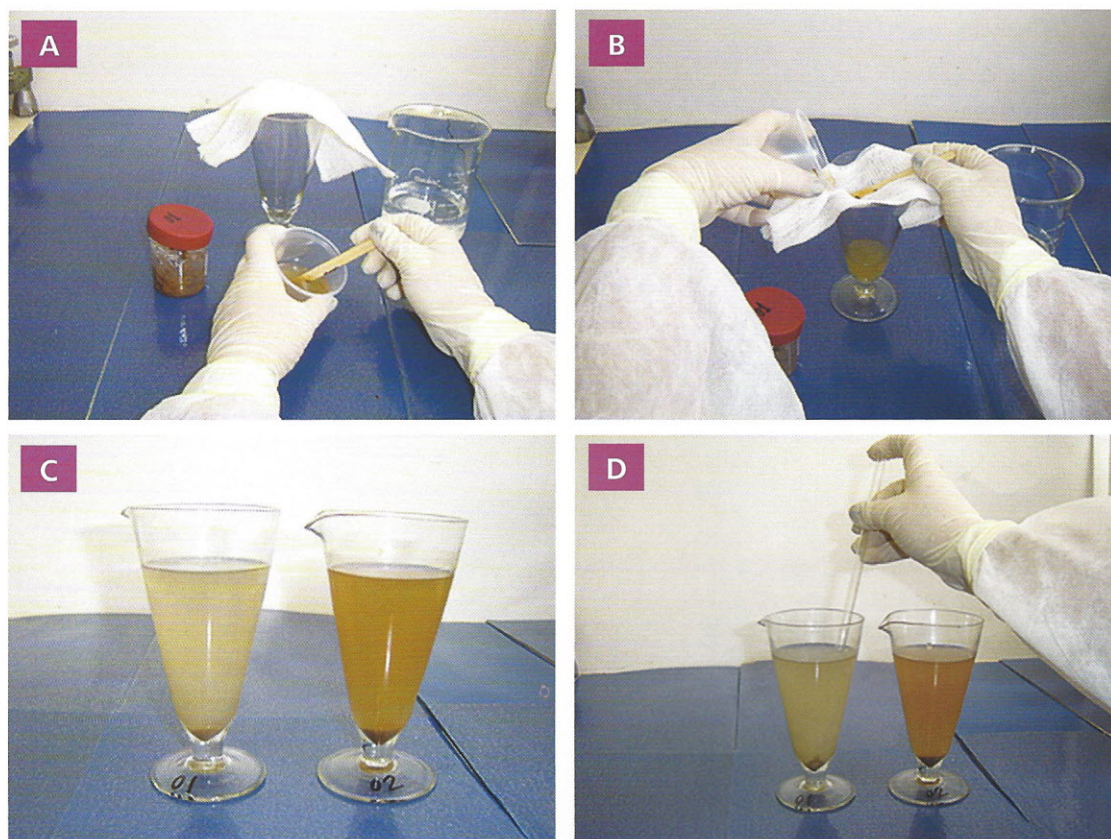
Método qualitativo por sedimentação espontânea (Técnica de Lutz), (Técnica de Hoffmann, Pons e Janer)

Esse método é baseado na sedimentação espontânea, sendo eficaz para ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários. É valioso para detecção de ovos pesados, especialmente para ovos de *Schistosoma mansoni*. A técnica foi descrita, inicialmente, utilizando água filtrada como diluente das fezes. Entretanto, deve ser usada a solução fisiológica 0,85% ou soluções fixadoras para o diagnóstico de *Blastocystis hominis*. Essas soluções fixadoras visam também à inativação de agentes potencialmente patogênicos que podem ser transmitidos pelo contato direto com as fezes ou por aerossóis.

- Misturar cerca de 2g de fezes em 10ml de solução fisiológica 0,85% ou soluções fixadoras em um copo plástico descartável.
- Emulsionar com espátulas de madeira descartável, adicionando aos poucos cerca de 20ml de solução fisiológica 0,85% ou soluções fixadoras.
- Coar em gaze dobrada quatro vezes, recolhendo o filtrado em cálice cônico para sedimentação. Deixar sedimentar, no mínimo, por duas horas.

- Aspirar o sedimento com pipeta Pasteur, depositando-o sobre uma lâmina. Se a preparação estiver muito espessa, diluir com uma solução salina a 0,85% ou solução fixadora. Colher amostras adicionais do centro e do fundo do sedimento. Cobrir a preparação com lamínula. O material pode ser examinado com ou sem Lugol.
 - Observar ao microscópio com aumento de 100x e 400x.
- Observe a seguir as etapas principais do método de sedimentação espontânea.

Figura 11 - Etapas principais do método de sedimentação espontânea



- a – Emulsionar as fezes em solução fisiológica ou solução fixadora
b – Filtrar em gaze dobrada
c – Sedimentar em cálice de vidro com fundo cônico
d – Retirar o sedimento com pipeta Pasteur

Fonte: Pinto PLS, 2010

Método qualitativo por centrífugo-extração/formol-éter modificado (adaptação da Técnica de Ritchie)

Método difásico que emprega uma suspensão fecal e um solvente orgânico (éter ou acetato de etila) como dissolvente de lipídios, que, com a centrifugação, favorece a eliminação de detritos para a concentração de oocistos de *Cryptosporidium* spp., *Isospora belli* e *Cyclospora cayetanensis*

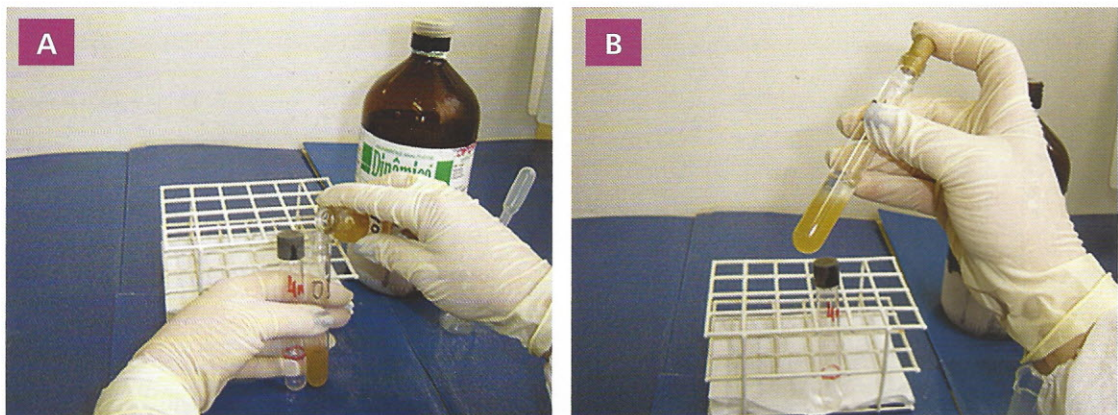
(coccídios intestinais), esporos de microsporídios, além de ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários no sedimento. O método pode ser utilizado a partir de fezes frescas e/ou coletadas em solução de formalina tamponada.

Atenção: a velocidade e o tempo de centrifugação foram adaptados para melhor concentração dos oocistos de coccídios intestinais e esporos de microsporídios.

- Homogeneizar aproximadamente 1g de fezes em 10ml de solução de formalina tamponada a 10% pH 7,0 em PBS.
- Filtrar, em gaze dobrada em quatro e umedecida, e transferir o filtrado para tubos de vidro 100x13mm com tampa de rosca ou tubos Falcon de 15ml. O material pode ser colocado em frascos de penicilina ou flaconetes e conservados em geladeira até a próxima etapa (a suspensão fica conservada por vários anos).
- Colocar em tubo de centrífuga 4ml do material conservado em formalina e adicionar 2ml de éter sulfúrico ou acetato de etila ou outro solvente orgânico.
- Agitar energicamente o frasco devidamente tampado.
- Centrifugar por oito minutos a 2.000rpm ou dez minutos a 1.500rpm.
- Desprezar o sobrenadante e, se necessário, limpar as paredes do tubo com um cotonete.
- O sedimento pode ser utilizado para o exame de diversos parasitos intestinais. Para a pesquisa de coccídios intestinais ou esporos de microsporídios, confeccionar esfregaço com o sedimento em lâminas bem limpas e desengorduradas e deixar secar ao ar.

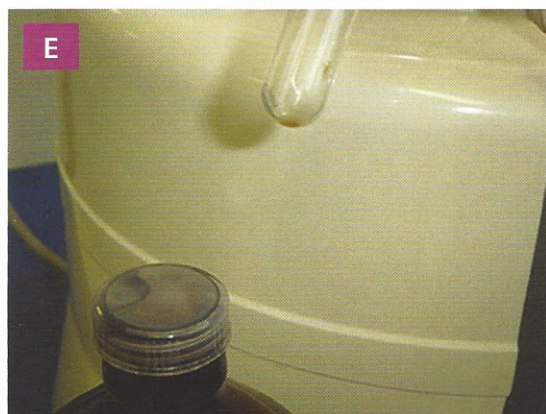
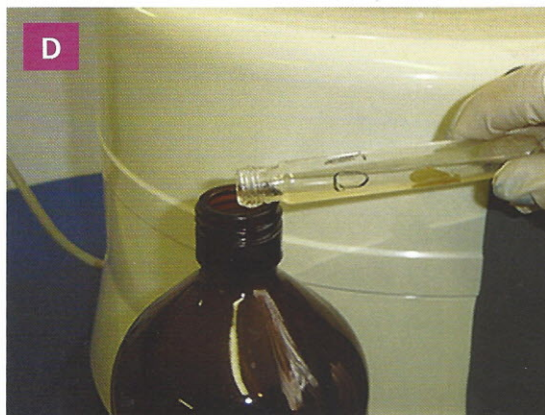
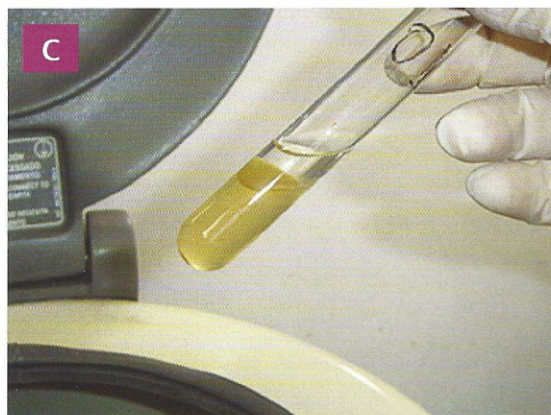
Observe a seguir as etapas principais do método por centrífugo-extração.

Figura 12 - Etapas principais do método qualitativo por centrífugo-extração



(continua)

(continuação)



- a – Colocar suspensão de fezes em um tubo
- b – Adicionar o solvente e agitar o frasco
- c – Centrifugar e observar a separação do material
- d – Desprezar o sobrenadante
- e – Examinar o sedimento formado

Fonte: Pinto PLS, 2010

Colorações especiais

As colorações especiais são utilizadas para o diagnóstico específico dos parasitos intestinais oportunistas e normalmente realizadas a partir de material concentrado ou de esfregaço em lâmina. São baseadas em características próprias desses parasitos. Os coccídios intestinais são evidenciados pelas propriedades álcool-ácido resistência dos oocistos. Para os microsporídios, são utilizadas técnicas de colorações baseadas no corante tricrômico, que ressalta as características que normalmente não são visualizadas em outras colorações. Para os *Blastocystis hominis* e *Strongyloides stercoralis* usa-se a coloração pelo Lugol. Em alguns casos especiais para identificação do *Blastocystis hominis*, há necessidade de realizar o diagnóstico diferencial com leucócitos e, para isso, utiliza-se coloração azul de metileno de Nair.

Coloração pela auramina O

Características da coloração:

A auramina O é uma coloração de triagem baseada na propriedade tintorial dos oocistos de coccídeos intestinais de serem álcool-ácido resistentes. Os oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de *Cyclospora cayatanensis* apresentam-se como estruturas arredondadas, emitindo fluorescência amarela-esverdeada. Os oocistos de *Isospora belli* são estruturas maiores e elípticas e emitem também fluorescência amarela-esverdeada.

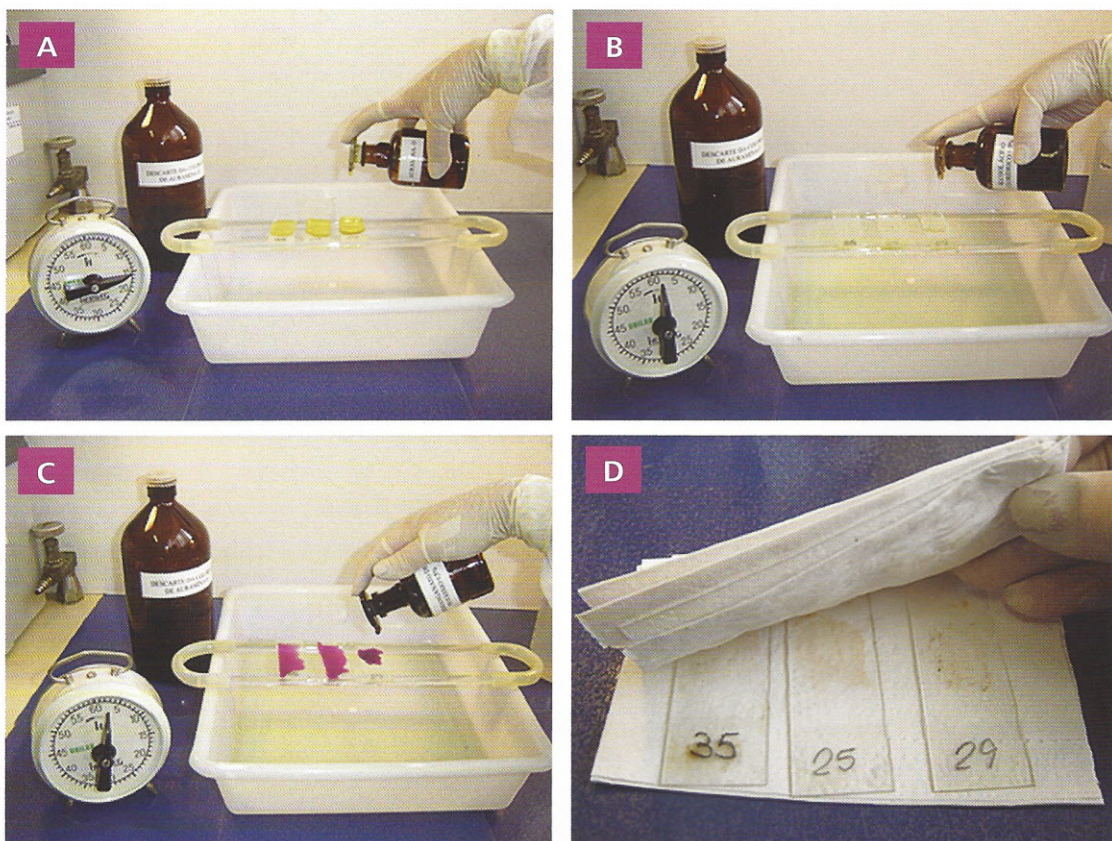
Procedimentos:

- Fixar o esfregaço com metanol.
- Cobrir o esfregaço com solução de auramina O por 15 minutos.
- Lavar em água corrente.
- Descolorir com álcool-ácido clorídrico 0,5% por dois minutos.
- Lavar em água corrente.
- Contrastar com solução de permanganato de potássio 0,5% por três minutos.
- Lavar em água corrente.
- Examinar pela microscopia de fluorescência (filtro 450nm – 495nm), de preferência até duas horas após a coloração.

Obs.: conservar as lâminas coradas no escuro até o momento da leitura. Deve-se corar uma lâmina controle positiva.

Observe a seguir as etapas principais da coloração pela auramina O.

Figura 13 - Etapas principais da coloração pela auramina O



(continua)

(continuação)

- a – Corar com auramina O
- b – Descorar com álcool ácido clorídrico 0,5%
- c – Contracorar com permanganato de potássio 0,5%
- d – Secar as lâminas em papel absorvente e mantê-las ao abrigo da luz

Fonte: Pinto PLS, 2010

Coloração pela fucsina e suas variações

1. Coloração pela fucsina-carbólica (Kinyoun)

Características da coloração:

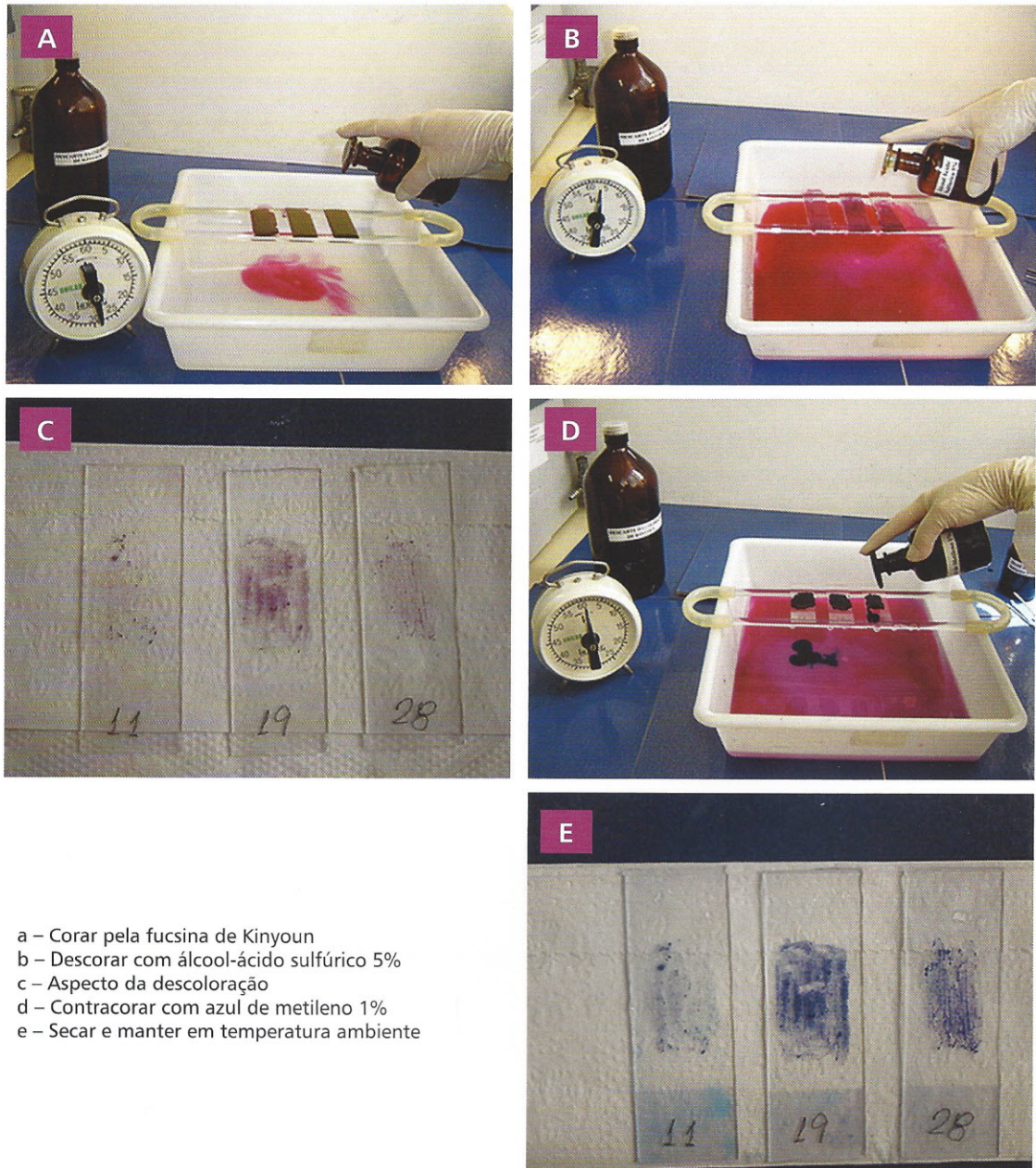
A fucsina carbólica é uma coloração confirmatória baseada na propriedade tintorial dos oocistos de coccídeos intestinais de serem álcool-ácido resistentes. Os oocistos de *Cryptosporidium* spp apresentam-se como estruturas arredondadas coradas de rosa avermelhado ou de vermelho intenso, medindo de 3µm a 6µm. Os oocistos de *Isospora belli* são estruturas maiores e elípticas, coradas de rosa avermelhado ou de vermelho intenso, medindo de 12µm a 30µm. Os oocistos de *Cyclospora cayetanensis* são estruturas arredondadas coradas de rosa avermelhado, algumas vezes muito claras ou até mesmo incolores (fantasmas), medem de 8µm a 10µm.

Procedimentos:

- Fixar o esfregaço com metanol ou corar sobre a própria lâmina previamente corada pela auramina O.
- Cobrir o esfregaço com solução de fucsina-carbólica durante 30 minutos, à temperatura ambiente (não aquecer).
- Lavar em água corrente.
- Cobrir a lâmina com álcool-ácido sulfúrico 5% até todo o excesso de corante ser removido.
- Lavar a lâmina em água corrente.
- Cobrir o esfregaço com azul de metileno 1% ou verde malaquita 2%, durante um minuto.
- Lavar em água corrente e deixar secar.

Observe a seguir as etapas principais da coloração pela fucsina de Kinyoun.

Figura 14 - Etapas principais da coloração pela fucsina de Kinyoun



- a – Corar pela fucsina de Kinyoun
- b – Descorar com álcool-ácido sulfúrico 5%
- c – Aspecto da descoloração
- d – Contracorar com azul de metileno 1%
- e – Secar e manter em temperatura ambiente

Fonte: Pinto PLS, 2010

2. Coloração de Ziehl-Neelsen modificada

Características da coloração:

São as mesmas da coloração de Kinyoun, diferindo na filtração dos corantes durante o processo de coloração e a etapa de aquecimento da fucsina.

Procedimentos:

- Com um pedaço de papel filtro, um pouco maior que o esfregaço, sobre a lâmina, pingar aproximadamente sete gotas de carbol-fucsina.
- Aquecer, com um bastão em chamas, quatro vezes a cada dois minutos, com o cuidado de não sair vapor.
- Tirar o papel cuidadosamente e descolorir o material com ácido sulfúrico 10%, por arraste.
- Pingar algumas gotas do descolorante (ácido sulfúrico a 10%) no material e deixar por, aproximadamente, um minuto.
- Lavar a lâmina com água e deixar escorrer o excesso.
- Colocar novamente papel filtro sobre a lâmina e pingar aproximadamente dez gotas de azul de metileno. Após três minutos, lavar a lâmina com água e deixar secar.

Obs.: a carbol-fucsina e o azul de metileno são os mesmos da coloração de Ziehl-Neelsen tradicional.

3. Coloração pela Safranina e Azul de Metileno

Características da coloração:

São as mesmas da coloração de Kinyoun. Recomendada para oocistos de *Cyclospora cayetanensis*, uma vez que evita o aparecimento das estruturas “fantasmas”.

Procedimentos:

- Fixar o esfregaço em chama.
- Fixar em metanol-ácido clorídrico 3% por três a cinco minutos.
- Lavar em água corrente.
- Corar com safranina por um minuto. Aquecer até ocorrer ebulição.
- Acrescentar mais corante e, se necessário, aquecer novamente.
- Lavar em água corrente.
- Contrastar com azul de metileno por 30 segundos.
- Lavar em água corrente.
- Secar a lâmina e observá-la ao microscópio (1.000x).

Atenção: considerando a semelhança entre a morfologia de *Cryptosporidium* e *Cyclospora*, uma vez que se coram da mesma maneira, na rotina, a diferenciação é feita pelo tamanho médio dos oocistos, que é de 4µm a 6µm para *Cryptosporidium* e de 8µm a 10µm para *Cyclospora* (Veja no Anexo II como realizar a medição das estruturas microscópicas).

A diferenciação definitiva entre os dois é feita, de forma mais precisa, após a esporulação dos oocistos e a confirmação por microscopia eletrônica de transmissão.

4. Coloração pelo Azul de Metileno de Nair

Características da coloração:

Coloração temporária que pode ser aplicada para o diagnóstico diferencial do *Blastocystis hominis* com cistos de amebas e leucócitos encontrados nas fezes. O corante de pH ácido diferencia melhor os núcleos dos protozoários. As formas evolutivas de *Blastocystis hominis* coradas por esse método apresentam, em geral, coloração azul com tonalidade mais clara no vacúolo e no citoplasma, contrastando com os núcleos mais escuros.

Procedimentos:

- Misturar uma pequena quantidade de fezes ou uma a duas gotas do material já concentrado em uma lâmina.
- Adicionar uma a duas gotas do corante.
- Misturar com a própria lamínula e cobrir a preparação.
- Esperar de cinco a dez minutos para que citoplasma e núcleo se corem, permitindo melhor visualização. Não ultrapassar 25 minutos para visualizar pela microscopia.
- Examinar no microscópio óptico comum pela objetiva de 40x. Se necessário, mensure as estruturas encontradas pela morfometria ocular.

Coloração Tricrômica e suas variações

1. Coloração pelo Gram – Cromotrope a Quente de Moura et al. (1997)

Características da coloração:

Esse método diferencia esporos de microsporídios de outros elementos fecais do fundo da preparação. Os esporos são estruturas ovais que medem de 0,8µm a 2,5µm. Na coloração tricrômica, adquirem cor rosa ou avermelhada refringente com presença de uma área mais clara. Na modificação de Moura et al. (1996), a combinação da coloração de Gram com a do Chromotrope permite diminuir o tempo total de coloração e os esporos apresentam-se com cor violeta.

Procedimentos:

- Preparar um esfregaço fino diretamente com as fezes conservadas em formalina tamponada e sem centrifugação ou utilizar amostras concentradas pelo método da centrífugo-extração, conforme descrito no item *Método qualitativo por centrífugo-extração/formol-éter modificado*.
- Deixar secar ao ar.
- Fixar pelo calor (três vezes, um segundo, em chama baixa ou cinco minutos a 60°C) ou pelo metanol.
- Deixar a lâmina esfriar, à temperatura ambiente, antes de corar.

Gram:

- Cobrir a lâmina com solução de violeta de genciana, segundo Gram, por um minuto.
- Lavar o excesso de corante.

- Cobrir a lâmina com solução de iodo por um minuto.
- Colocar a lâmina em ângulo e gotejar solução descorante até sair límpida.
- Lavar a lâmina com água corrente para remover o excesso do descorante.

Tricrômica:

- Colocar a lâmina em solução tricrômica por um minuto a 50°C.
- Lavar em álcool-ácido 90% por um a três segundos.
- Lavar em álcool-etílico 95% por 30 segundos.
- Lavar duas vezes em álcool-etílico absoluto por 30 segundos.
- Deixar secar e examinar o esfregaço, em imersão (1.000x).

2. Chromotrope a quente de Kokoskins et al. (1994)

Características da coloração:

Modificação a partir do método de Weber e col. 1992. Ao introduzir na etapa do corante aquecimento a 50°C e redução de seu tempo, obtém-se coloração de maior intensidade nos esporos e melhor destaque com as outras estruturas do campo microscópico. Nessa coloração, os esporos adquirem cor rosa ou avermelhada refringente com a presença de uma área mais clara.

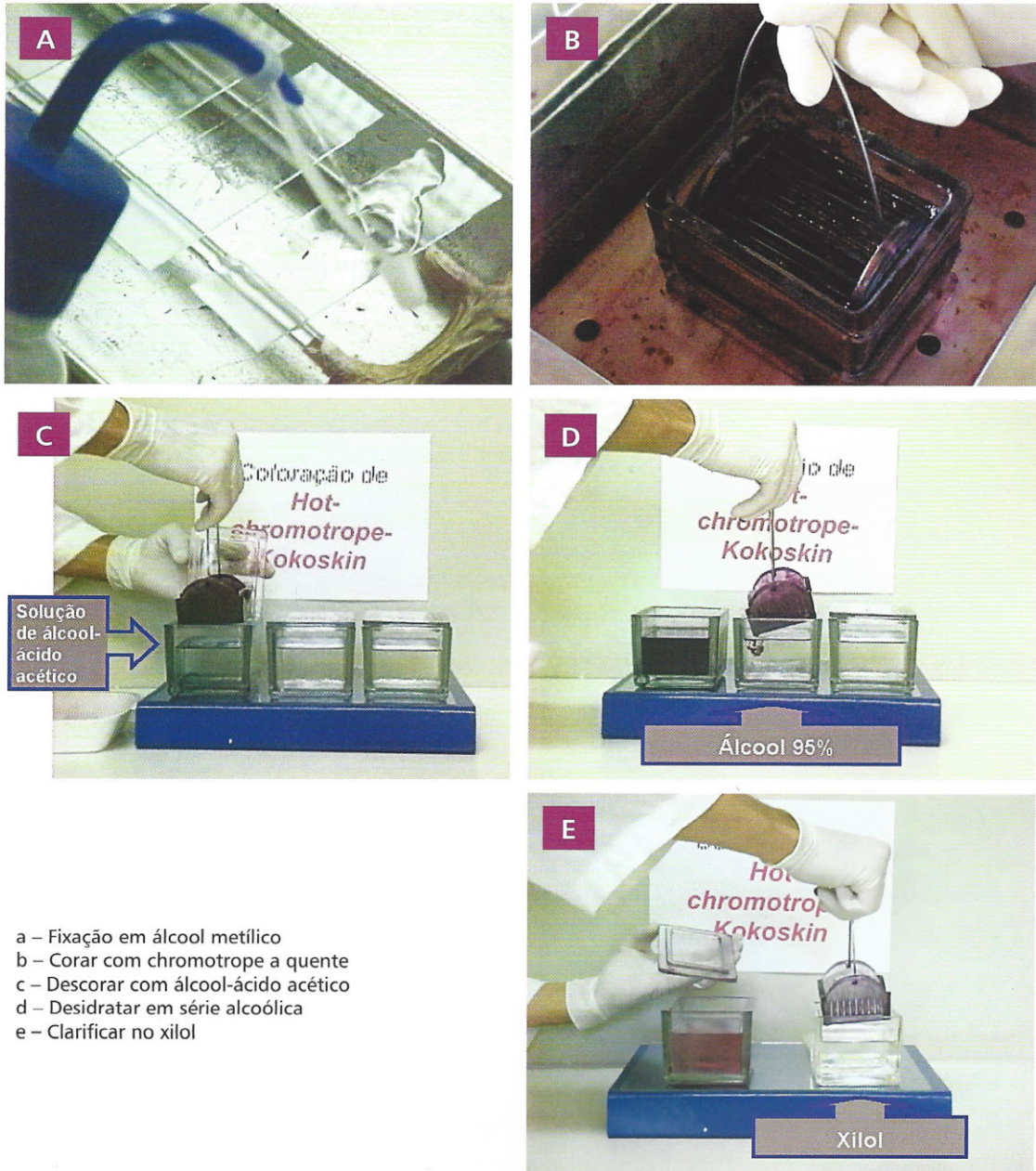
Procedimentos:

- Usar alíquota de 5µl de fezes previamente concentradas pelo método da centrífugo-extração, conforme descrito no item *Método qualitativo por centrífugo-extração/formol-éter modificado*.
- Preparar o esfregaço fino em uma área total de 45mn x 25mn.
- Deixar secar à temperatura ambiente.
- Fixar com álcool metílico por dez minutos.
- Deixar secar à temperatura ambiente.
- Corar a lâmina com chromotrope 2R por dez minutos.
- Drenar o corante e lavar com solução ácido-álcool por dez segundos.
- Imergir rapidamente a lâmina por três a quatro vezes em álcool etílico a 95%.
- Lavar com álcool etílico a 95% por cinco minutos.
- Lavar com álcool etílico a 100% por dez minutos.
- Imergir em xilol por dez minutos.
- Montar em resina sintética e observar o esfregaço em imersão.

Atenção: cubas de coloração devem ser utilizadas em todas as etapas do processo.

Observe a seguir as etapas principais da coloração chromotrope a quente de Kokoskins et al. (1994).

Figura 15 - Etapas principais da coloração de chromotrope a quente de Kokoskins



- a – Fixação em álcool metílico
- b – Corar com chromotrope a quente
- c – Descorar com álcool-ácido acético
- d – Desidratar em série alcoólica
- e – Clarificar no xilol

Fonte: Pinto PLS, 2010

OUTROS AGENTES OPORTUNISTAS NÃO INTESTINAIS

Pneumocystis jirovecii

Para o diagnóstico da pneumocistose, considerando a simplicidade, o custo e a especificidade, são recomendados para diagnóstico inicial métodos de colorações específicas devidamente padronizadas. As técnicas imunobiomoleculares, apesar de apresentarem elevada sensibilidade e especificidade, são ainda de elevado custo e disponíveis somente em laboratórios de referência. A seguir, estão listados os métodos e as respectivas técnicas que podem ser utilizados no diagnóstico laboratorial do *Pneumocystis jirovecii*

Quadro 3 - Fluxograma do diagnóstico de *Pneumocystis jirovecii*

AMOSTRA			
Amostra in natura			
Esfregaço direto em lâmina	Esfregaço em lâmina após fluidificação e centrifugação	Técnicas Imunológicas (esfregaço em lâmina)	Técnicas Moleculares (amostras conservadas a -20°C)
Pesquisa de cistos	Pesquisa de cistos	Pesquisa de antígenos	Pesquisa de DNA
Colorações		Imunofluorescência direta – IFD	Reação em Cadeia de Polimerase – PCR
Azul de toluidina Impregnação pela prata (Gomori)			

Técnicas de coleta da amostra

Para a pesquisa do *P.jirovecii* podem ser utilizadas amostras de lavado broncoalveolar, aspirado traqueal (crianças), biópsia pulmonar (procedimento especial) e escarro (preferencialmente o induzido). Os pacientes suspeitos de pneumocistose podem ser diagnosticados pela análise do escarro induzido. Para maior eficiência no diagnóstico, oriente o paciente a seguir as etapas de coleta, acondicionamento e transporte da amostra recomendadas no item Em outros materiais biológicos. Quando o agente não for revelado no escarro, e mantida a suspeita clínica, o paciente poderá ser submetido à lavagem broncoalveolar ou a outros procedimentos mais invasivos. Nesse caso, a coleta será realizada por equipe especializada.

Esfregaço direto em lâmina após centrifugação

Observe a viscosidade do material e siga o seguinte procedimento:

Material não espesso e com pouco muco:

- Transfira uma alíquota do material para tubo de Falcon de 15ml.
- Dilua com solução fisiológica na razão de 1:1.
- Homogeneíze manualmente por agitação ou em “vortex” por um minuto.
- Centrifugue a 3.000rpm por 15 minutos.
- Faça esfregaços finos e centralizados em duas lâminas.

- Fixe-os pelo calor a 56°C por, no mínimo, uma hora.

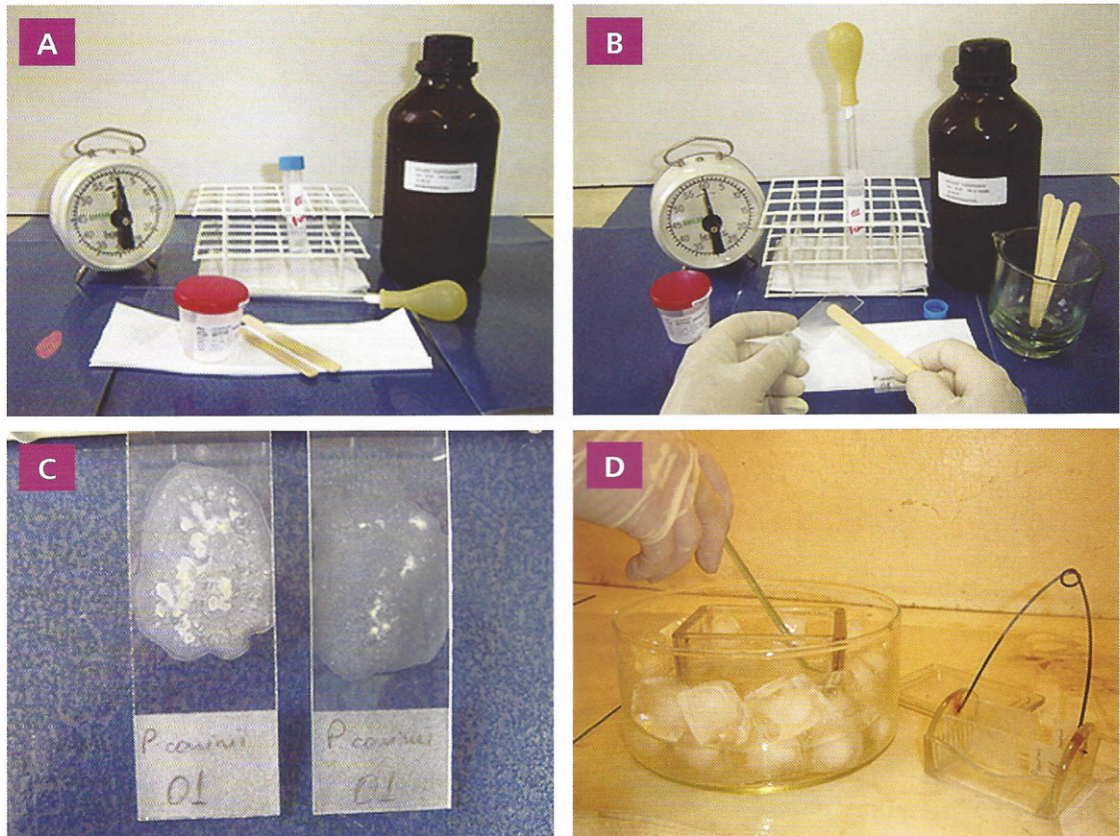
Esfregaço em lâmina após fluidificação e centrifugação

Material espesso e com muito muco:

- Transfira uma alíquota do material para tubo de falcon de 15ml.
- Dilua com fluimicil (fluidificante) na razão de 1:1.
- Deixe em temperatura ambiente com agitação eventual por cinco a seis horas.
- Caso não consiga fluidificar, deixe por uma noite a 4°C.
- Centrifugue a 3.000 rpm por 15 minutos.
- Faça esfregaços finos e centralizados em duas lâminas.
- Fixe-os pelo calor a 56°C por no mínimo uma hora.

Observe a seguir as etapas principais da confecção do esfregaço e do tratamento com reagente sulfatado para a pesquisa do *Pneumocystis jirovecii*.

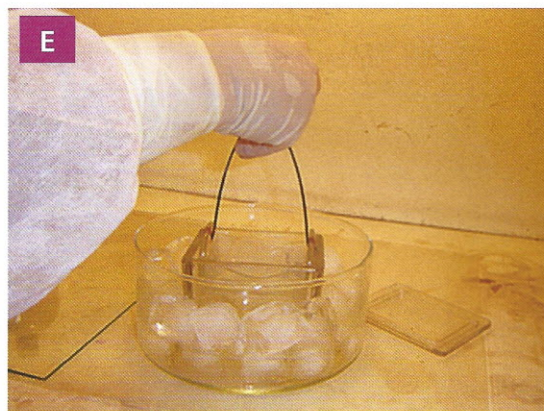
Figura 16 - Etapas principais da confecção do esfregaço e do tratamento com reagente sulfatado na coloração de azul de toluidina O



(continua)

(continuação)

- a – Material usado na fluidificação
- b – Confecção de esfregaço em lâmina
- c – Esfregaços prontos e fixados pelo calor
- d – Preparo do reagente sulfatado
- e – Adição dos esfregaços no reagente



Fonte: Pinto PLS, 2010

Colorações especiais

Coloração pelo azul de toluidina O

Características da coloração:

As formas císticas apresentam coloração lavanda, contorno distinto e delgado, com a região interna corada uniformemente. Normalmente são observadas em agrupamentos não apresentando brotamento. As leveduras são distinguidas pela parede mais espessa e forma oval. O emprego do reagente sulfatado confere coloração de fundo mais claro que destaca as formas císticas.

Procedimentos:

- Preparar o reagente sulfatado e deixar em repouso por dez minutos.
- Colocar as lâminas já secas no porta-lâminas e introduzi-lo na jarra de Coplin contendo reagente sulfatado em banho de gelo.
- Deixar por dez minutos.
- Lavar em água corrente por cinco minutos.
- Tirar o excesso de água, movimentando o porta-lâminas sobre papel toalha.
- Em seguida, colocar na solução de azul de toluidina O por três minutos.
- Retirar o porta-lâminas do corante, escorrer o excesso e mergulhá-lo rapidamente em álcool absoluto. Repetir o procedimento em outra cuba.
- Secar as lâminas individualmente em papel toalha para a retirada total do álcool.
- Passar em banho de xilol por dois minutos.

Atenção: o tempo de coloração pode ser regulado pela espessura do esfregaço: se esfregaço fino, o tempo pode ultrapassar três minutos, chegando até cinco minutos; se esfregaço grosso, não é recomendado ultrapassar três minutos, uma vez que nessa coloração não há fase de diferenciação.

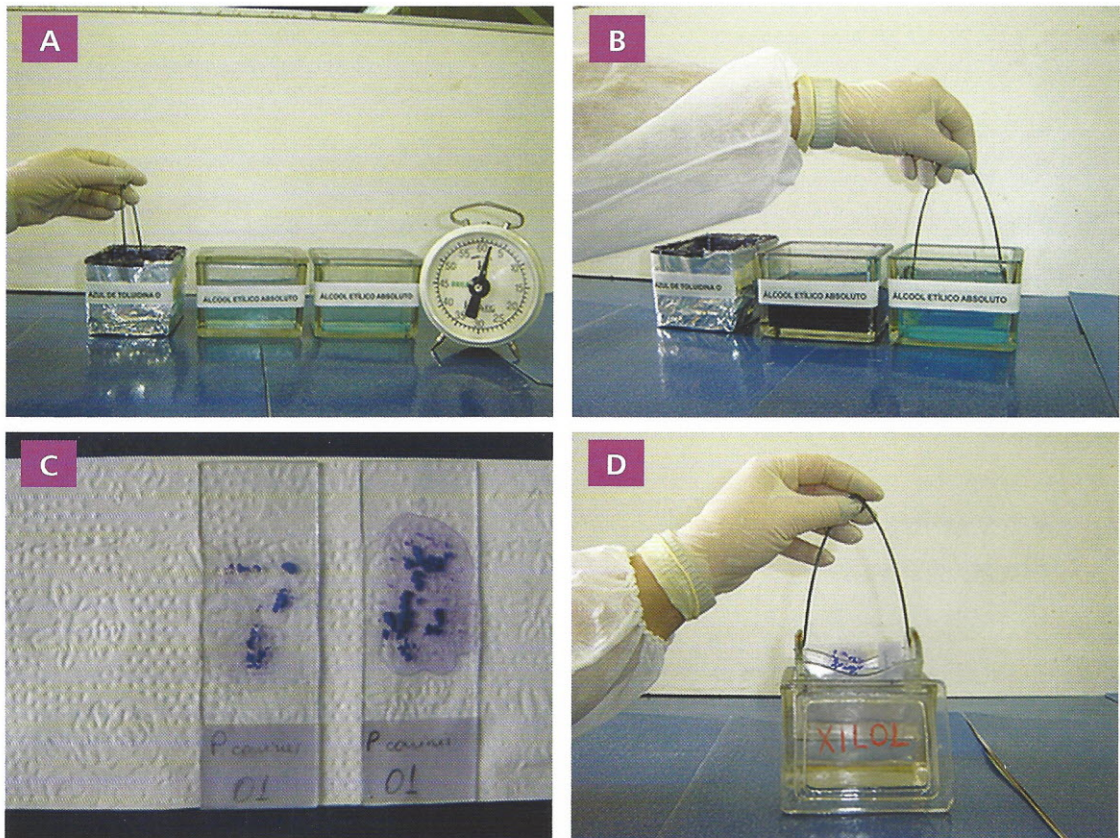
Montagem das lâminas em resina:

- Adicionar duas gotas de resina na lâmina úmida de xilol. O xilol facilita a fixação da lamínula com a resina.
- Cobrir com lamínula, fazendo pequena compressão com uma espátula de madeira. Esse procedimento facilita a distribuição da resina sobre o esfregaço e evita a formação de bolhas.
- Tirar o excesso de resina, virando a lâmina montada pela lateral sobre papel toalha e deixar secar.

Atenção: o tempo de secagem da resina depende da temperatura ambiente – em dias quentes, no mínimo 24 horas; em dias frios, no mínimo 48 horas.

Observe a seguir as etapas principais da coloração pelo azul de toluidina O.

Figura 17 - Etapas principais da coloração de azul de toluidina O



- a – Corar pelo azul de toluidina O
- b – Desidratar em série alcoólica
- c – Aspecto dos esfregaços corados
- d – Clarificar em xilol

Fonte: Pinto PLS, 2010

Coloração pelo método de impregnação pela prata metenamina de Gomori, segundo Grocott (1955)

Características da coloração:

Método que permite o diagnóstico de pneumocistose em diferentes tipos de amostras clínicas, incluindo material de biópsia. O complexo de corantes utilizados permite corar a parede celular do fungo, conferindo uma tonalidade marrom. A mucina presente nos elementos glandulares é corada de cinza escuro, contrastando com a coloração de fundo verde-claro. Apesar de eficiente, este método é oneroso e complexo.

Procedimentos:

Cortes histológicos de material de biópsia

- Desparafinizar os cortes histológicos em estufa à temperatura de 60°C por cinco minutos.
- Colocar as lâminas no porta-lâminas e introduzi-lo na jarra de Coplin contendo xilol.
- Deixar por dez minutos.
- A partir desta fase, seguir os procedimentos descritos a seguir.

Esfregaços em lâminas

- Colocar as lâminas no porta-lâminas e introduzi-lo na jarra de Coplin contendo álcool 100% e deixar por cinco minutos.
- Transferir para o álcool 70% e deixar por cinco minutos.
- Transferir para o álcool 50% e deixar por mais cinco minutos.
- Deixar em água destilada por cinco minutos.
- Oxidar em solução de ácido crômico deixando por uma hora.
- Lavar em água corrente durante dez minutos.
- Lavar em água corrente durante dez minutos.
- Deixar na solução de prata metenamina em estufa a 58°C até que o esfregaço fique amarelo pardo, cerca de 20 a 30 minutos.
- Tirar da solução e mergulhar em água destilada realizando seis mudanças de água.
- Colocar na solução de cloreto de ouro por dois minutos.
- Tirar da solução e mergulhar em água destilada realizando duas mudanças de água.
- Colocar na solução de tiosulfato de sódio por três minutos.
- Lavar em água corrente.
- Colocar na solução corante Papanicolau (EA-36) por cinco minutos.
- Desidratar em série alcoólica: álcool 95% por três minutos e álcool 100% por um minuto.
- Deixar em banho de xilol por dez minutos.
- Montar as lâminas em resina sintética conforme recomendado para a coloração de azul de toluidina O.

CAPÍTULO 4

Rotinas diagnósticas recomendadas para a detecção de agentes oportunistas em laboratórios de saúde pública

Como apresentado no capítulo *Métodos de detecção de agentes oportunistas na rotina diagnóstica*, há uma ampla metodologia disponível para o diagnóstico laboratorial das infecções parasitárias oportunistas intestinais causadas por *Cryptosporidium* spp, *Isospora belli*, *Cyclospora cayetanensis*, *Blastocystis hominis*, microsporídios e *Strongyloides stercoralis* e das infecções pulmonares causadas por *Pneumocystis jirovecii*. A escolha de métodos adequados para atender as rotinas diagnósticas visa otimizar os serviços e garantir a qualidade e a confiabilidade dos exames realizados em laboratórios de saúde pública. No entanto, essa escolha não representa uma tarefa fácil, uma vez que diversos fatores podem influenciar direta ou indiretamente a tomada de decisão. A sensibilidade, o custo e a complexidade das técnicas e a habilidade e a capacitação dos profissionais envolvidos no diagnóstico podem interferir diretamente nessa escolha. Por outro lado, deve-se considerar também que pacientes poderão apresentar infecções concomitantes por outros agentes que não os oportunistas, implicando o uso de técnicas mais gerais. Soma-se a isso o fato de que os laboratórios de saúde pública apresentam outras missões, destacando, por exemplo, o apoio diagnóstico na investigação de surtos de diarreia aguda transmitida por água e alimentos, em que os agentes envolvidos podem ou não ter caráter oportunista. Serão apresentadas neste capítulo as rotinas mais recomendadas para atendimento das demandas nesses laboratórios.

DIAGNÓSTICO DAS ENTEROPARASIToses E PARASIToses INTESTINAIS OPORTUNISTAS

Três etapas são recomendadas para o diagnóstico laboratorial das enteroparasitoses e parasitoses intestinais oportunistas em laboratórios de saúde pública. Na primeira etapa, a análise inicia-se com a amostra de fezes sem conservante. Exame direto a fresco e corado pelo lugol, realizado em fezes diarreicas para a identificação de trofozoítos. Em seguida, independentemente da sua consistência, o material deverá ser processado pelo método de Rugai para identificação de larvas após coloração pelo lugol. Veja na seção *Métodos para extração de larvas das fezes* os cuidados que devem ser observados em relação às amostras submetidas ao método de Rugai. Observe no esquema a seguir os procedimentos iniciais com a amostra de fezes sem conservante.

Quadro 4 - Fluxograma para processamento de amostras sem conservantes

AMOSTRA DE FEZES SEM CONSERVANTE	
Diarreica	Normais, pastosas ou diarreicas
Exame direto	Pesquisa de larvas Rugai
A fresco Lugol	Lugol
Identificação de trofozoítos	Identificação de larvas <i>Strongyloides stercoralis</i>

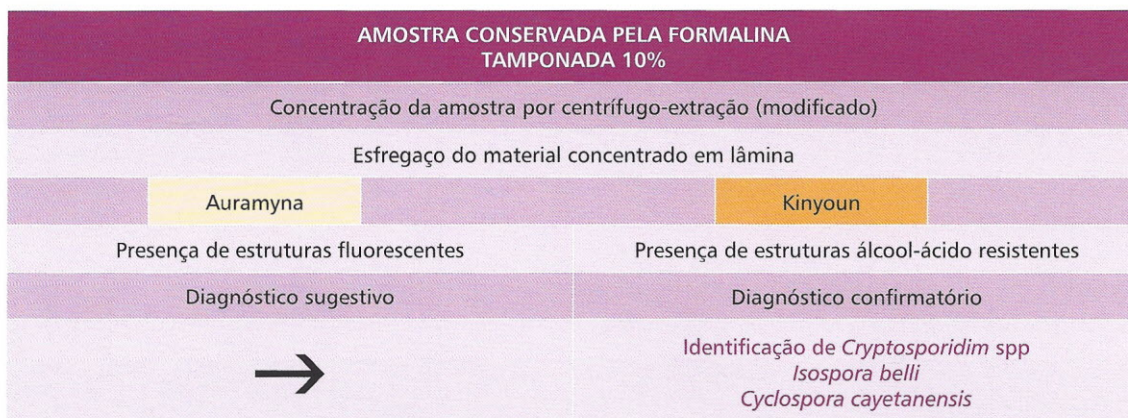
Na segunda etapa, as fezes são conservadas pela formalina tamponada a 10% e o material submetido aos métodos de concentração pela sedimentação espontânea e de centrífugo-extração (modificado), para a identificação de cistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos. A coloração pelo lugol auxiliará o diagnóstico. As formas evolutivas de *Blastocystis hominis* serão pesquisadas nesta etapa. Caso necessite, utilize a coloração de azul de metileno de Nair para o diagnóstico diferencial desse protozoário. Consulte a seção *Coloração pelo azul de metileno de Nair* e siga corretamente as etapas de coloração. Observe no esquema a seguir os procedimentos com as fezes conservadas e os critérios adotados para o encaminhamento das amostras para a pesquisa de coccídios intestinais e microsporídios (terceira etapa).

Quadro 5 - Fluxograma para processamento de amostras conservadas em formalina tamponada 10%

AMOSTRA CONSERVADA PELA FORMALINA TAMPONADA 10%		
Concentração da amostra pela sedimentação espontânea e centrífugo/extração (modificado)		
Lugol		
Identificação de cistos, ovos e larvas		
Libera resultado positivo ou negativo		
Fezes diarreicas	Fezes pastosas ou normais	
Imunocomprometido Imunocompetente (até 5 anos) Imunocompetente adulto	Imunocomprometido Imunocompetente (até 5 anos)	Imunocompetente adulto
Pesquisa de coccídios intestinais e microsporídios	Pesquisa de coccídios intestinais e microsporídios	Libera resultado positivo ou negativo

Na terceira etapa, realiza-se a investigação específica dos parasitos oportunistas intestinais representados pelos coccídios intestinais e pelos microsporídios. A pesquisa de coccídios intestinais e de microsporídios é recomendada para pacientes imunocomprometidos, independentemente da consistência das fezes. Em pacientes adultos imunocompetentes, a pesquisa de coccídios intestinais e microsporídios é recomendada só em casos de diarreia, quando não há outros agentes relacionados ao quadro clínico. Em crianças imunocompetentes – até 5 anos –, principalmente naquelas que frequentam creches, deve-se pesquisar oocistos de *Cryptosporidium* spp e esporos de microsporídios. Nessas situações deve-se também ter atenção para a ocorrência de cistos de *Giardia lamblia*. Neste caso, o diagnóstico pode ser realizado já na segunda etapa do processo. Em situação de surto de diarreia em creches, oocistos de *Cryptosporidium* spp foram observados em fezes pastosas ou normais de crianças, até 30 dias após o período diarreico. Observe no esquema a seguir os procedimentos para a pesquisa de oocistos de coccídios intestinais.

Quadro 6 - Fluxograma para processamento de amostras para a pesquisa de oocistos de coccídios intestina



A coloração pela auramina O é uma prática eficiente para triagem das amostras negativas, permitindo o exame de grande número de lâminas, com redução no tempo para o diagnóstico. Note que toda lâmina “positiva” nessa coloração deverá, obrigatoriamente, ser confirmada pela coloração de Kinyoun. A coloração de Kinyoun é processada na mesma lâmina de triagem. O emprego da coloração de auramina O na rotina diagnóstica é facultativo, podendo o laboratório optar por essa metodologia dependendo do número de amostras analisadas e da disponibilidade do microscópio de fluorescência e de insumos. Já a coloração de Kinyoun ou as variações das colorações pela fucsina são de uso obrigatório na rotina diagnóstica dos coccídios intestinais.

Esporos de microsporídios são pesquisados em esfregaços delgados diretamente das fezes conservadas pela formalina tamponada a 10% ou a partir do mesmo material concentrado para a pesquisa de coccídios intestinais. O uso de esfregaços finos corados pela coloração tricrômica facilita o reconhecimento dos esporos, permitindo diferenciá-los de outras estruturas, como leveduras e bactérias. No entanto, resultados duvidosos podem ocorrer, nesses casos deve-se repetir o exame da mesma amostra ou solicitar novo material para confirmação dos resultados. Veja na seção *Coloração Tricrômica e suas variações*, as variações da coloração tricrômica que podem ser utilizadas na rotina diagnóstica desse protozoário e siga-as corretamente.

DIAGNÓSTICO DA PNEUMOCISTOSE

Para a pesquisa do *Pneumocystis jirovecii* em amostras de lavado broncoalveolar, aspirado traqueal e escarro induzido, é necessário o cumprimento de três etapas: a primeira, referente ao preparo da amostra para concentração, conforme a sua viscosidade; a segunda, com relação ao preparo do reagente sulfatado e ao tratamento dos esfregaços e; a terceira, diz respeito à coloração dos esfregaços pelo azul de toluidina O. Observe no esquema a seguir os procedimentos da primeira etapa.

Quadro 7 - Fluxograma para processamento inicial da fluidificação da amostra

AMOSTRA SEM CONSERVANTE ACONDICIONADA SOB REFRIGERAÇÃO	
Amostra pouco viscosa	Amostra muito viscosa
Diluição com solução fisiológica (1:1)	Diluição com fluidificante (1:1) Aguardar por cinco a seis horas
Concentração por centrifugação	
Esfregaços finos em lâminas	

Nesta etapa, a fase de fluidificação poderá ser ampliada em função do grau de viscosidade da amostra. Caso não ocorra a fluidificação no tempo determinado, o material poderá ficar na solução fluidificante por uma noite em refrigerador a 4°C. A confecção dos esfregaços é uma fase crítica no processo. Para obtenção de bons resultados, siga corretamente os procedimentos descritos nas seções *Esfregaço direto em lâmina após centrifugação* e *Esfregaço em lâmina após fluidificação e centrifugação*.

Na segunda etapa do processo, o reagente sulfatado é preparado no momento do uso, diretamente no porta-lâminas, dentro de recipiente contendo água e gelo. É essencial o repouso antes do uso, uma vez que a mistura é corrosiva e pode agir sobre o esfregaço. O reagente tem a função de promover a clarificação prévia do esfregaço, facilitando a coloração.

Na terceira etapa, inicia-se o processo de coloração dos esfregaços previamente tratados. O azul de toluidina O tem mostrado bons resultados, conferindo aos cistos uma coloração azulada (lavanda) que se destaca do campo microscópico, facilitando a identificação, além de representar uma técnica rápida e de menor custo em relação à coloração pelo Método de impregnação pela prata metenamina de Gomori, segundo Grocott (1955). Os procedimentos referentes à segunda e à terceira etapas estão descritos na seção *Coloração pelo azul de toluidina O*. Observe no esquema a seguir os procedimentos para a pesquisa de cistos de *Pneumocystis jirovecii* em esfregaços previamente tratados com reagente sulfatado.

Quadro 8 - Fluxograma para processamento de amostras na coloração de Azul de toluidina O

ESFREGAÇO EM LÂMINA TRATADO NO REAGENTE SULFATADO	
	Azul de toluidina O
Desidratação rápida em álcool absoluto	
Diafanização em xilol	
Identificação de cistos de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	

Apresentação dos resultados

Todos os agentes encontrados nos exames deverão ser relatados, sejam eles patogênicos ou não.

As formas evolutivas observadas deverão ser citadas (ovos e larvas de helmintos; trofozoítos, cistos, oocistos e esporos de protozoários), assim como o nome científico dos agentes, incluindo o gênero e a espécie, quando possível.

Devem ser citados os métodos usados e o número de amostras examinadas.

CAPÍTULO 5

Métodos de conservação de amostras e procedimentos para encaminhamento

Para garantir resultados satisfatórios nos exames parasitológicos, devem-se adotar medidas que visam preservar as formas parasitárias nas amostras biológicas. A conservação das amostras é necessária quando não for possível o encaminhamento imediato ao laboratório ou quando os procedimentos não forem executados no mesmo dia da coleta. A conservação impede a proliferação de organismos indesejáveis nas amostras, evitando a deterioração. Os métodos de conservação podem ser temporários ou permanentes.

MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO TEMPORÁRIOS

Refrigeração

As amostras biológicas devem estar devidamente identificadas em recipientes fechados e mantidas sob refrigeração de 4°C a 8°C. Ovos de helmintos e cistos, oocistos e esporos de protozoários conservam-se viáveis, nessas condições, por 24 a 48 horas. Larvas de helmintos e trofozoítos de protozoários tornam-se inviáveis e com alterações morfológicas. Amostras de lavado broncoalveolar, aspirado traqueal e escarro para o diagnóstico de *Pneumocystis jirovecii* são conservadas por 24 horas sob refrigeração.

Solução de bicromato de potássio a 2,5%

Essa solução não é fixadora, mas preserva a viabilidade dos cistos e oocistos de protozoários até três meses após a coleta, quando armazenados à temperatura de 4°C. É utilizada na proporção de uma parte de fezes para três partes da solução, que pode ser usada na esporulação de oocistos de *Isospora belli* e *Cyclospora cayentamensis*. Com esse propósito, o material deverá ser acondicionado em temperatura ambiente.

Congelamento

A conservação por congelamento de amostras biológicas destinadas ao diagnóstico morfológico das enteroparasitoses, parasitoses intestinais oportunistas e pneumocistose não é recomendada. O congelamento seguido do descongelamento altera as características morfológicas dos agentes. O congelamento é usado para os procedimentos de Biologia Molecular nos quais os fixadores químicos, como a solução tamponada de formalina 10%, interferem na extração de DNA.

MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO PERMANENTES

Obtém-se a preservação permanente de ovos e larvas de helmintos, bem como trofozoítos, cistos, oocistos e esporos de protozoários por meio de soluções fixadoras. As soluções mais utilizadas na rotina de diagnóstico são: solução tamponada de formalina a 10% e a solução de acetato de sódio, ácido acético e formaldeído – SAF. São soluções estáveis com longo período de validade e ação fixadora a partir de duas horas. São utilizadas na proporção de uma parte de fezes para três partes das soluções. A solução tamponada de formalina a 10% não interfere nos processos de coloração

pela auramina O, pela fucsina e suas variações e pela coloração tricrômica e suas variações. Ao que tudo indica, o fixador de SAF também não interfere nos processos de coloração para o diagnóstico dos parasitos oportunistas, mas isso carece de maiores investigações.

Nota: o fixador de schaudinn não é mais recomendado, pois apresenta em sua fórmula cloreto de mercúrio II, substância tóxica ao homem e ao meio ambiente.

PROCEDIMENTOS PARA ENVIO DAS AMOSTRAS

Para o diagnóstico das enteroparasitoses, parasitoses intestinais oportunistas e pneumocistoses, o serviço médico ou o próprio paciente devem ser orientados para que colem as amostras preferencialmente no início dos sintomas e antes da administração de antiparasitários ou de outros medicamentos. Os frascos contendo as amostras deverão estar com a identificação do paciente e acondicionados em sacos plásticos (um para cada amostra). Observe a seguir os procedimentos para envio das amostras, conforme a natureza do diagnóstico.

Quadro 9 - Fluxograma para o envio de amostras

TIPO DE DIAGNÓSTICO	MATERIAL	ACONDICIONAMENTO	TRANSPORTE E CONSERVAÇÃO
Enteroparasitoses	Fezes frescas	Frasco do tipo universal sem conservantes	Temperatura ambiente até duas horas, após esse período manter refrigerado; transportar em caixa térmica sob refrigeração de 24 a 48 horas após a coleta
Parasitos oportunistas intestinais	Fezes frescas	Frasco do tipo universal sem conservantes	Temperatura ambiente até duas horas, após esse período manter refrigerado; transportar em caixa térmica sob refrigeração de 24 a 48 horas após a coleta
Pneumocistose	Lavado broncoalveolar, Aspirado traqueal e Escarro, preferencialmente induzido	Frasco do tipo universal sem conservantes	Manter refrigerado; transportar em caixa térmica sob refrigeração até 24 horas após a coleta

AMATO NETO, V. (Ed.). et al. **Parasitologia**: uma abordagem clínica. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 434p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria no 2.031, de 23 de setembro de 2004. Dispõe sobre a organização do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 8 jan. 2002. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. **biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia**. Brasília, DF, 2006. 290 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Parasitas e Aids**: diagnóstico laboratorial das infecções oportunistas. Brasília, DF, 2008. 144p. (Série Telelab).

CALL, A.; KOTLER, D. P.; ORENSTEIN, J. M. Septata intestinalis N. G., N. Sp., an Intestinal Microsporidian Associated with Chronic Diarrhea and Dissemination in AIDS Patients. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 40, n. 1, p. 101-112, 1993.

DE CARLI, G. A. Identificação de enteroparasitas: diagnóstico laboratorial de microsporídeos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 134-137, 1996.

DE CARLI, G. A. (Ed.). **Parasitologia clínica**: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas. São Paulo: Atheneu, 2001. 810 p.

GOSEY, L. L. et al. Advantages of a modified toluidine blue O stain and broncho alveolar lavage for the diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 25, p. 803-807, 1985.

GROCOTT, R.G. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technique. *Am. J. Clin. Pathol.* 25: 975-979, 1955.

KOKOSKINS, E. et al. Modified technique for efficient detection of microsporidia. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 32, p. 1074-1075, 1994.

MAGI, B. et al. Cryptosporidium infection: diagnostic techniques. **Parasitology Research**, Berlin, v. 98, n. 2, p. 150-152, 2006.

MOURA, H. et al. Gram-chromotrope: a new technique that enhances detection of microsporidial spores in clinical samples. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Lawrence, v. 43, n. 5, p. 954-955, 1996.

MOURA, H., D. A. Schwartz, F. Bornay-Llinares, F. C. Sodre, S. Wallace, and G. S. Visvesvara. A new and improved "quick-hot Gram-chromotrope" technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples including paraffin-embedded tissue sections. *Archives for Pathology in Laboratory Medicine*, Chicago, v.121, n. 8, p. 888-893, 1997.

NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 494p.

NIELSEN, P. B.; GOYOT, P.; MOJON, M. The microscopic diagnosis of *Pneumocystis carinii*. **Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**: Section B, Microbiology, Copenhagen, v. 94, n. 1, p. 19-23, 1986.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Manual de segurança biológica em laboratório**. 3. ed. Genebra: OMS, 2004. 203 p.

SODRE, F. C. et al. Descrição de um método modificado para a concentração de esporos nas fezes para o diagnóstico das microsporidioses intestinais. **Jornal Brasileiro de Patologia**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 4, p.126-133, 1995.

THOMPSON, R. C. et al. *Cryptosporidium* and cryptosporidiasis. **Advances in Parasitology**, London, v. 59, p.77-158, 2005.

TORRES, D. M. A. G. V. et al. Diagnóstico laboratorial de *Pneumocystis carinii* em vários tipos de amostras de materiais de secreção pulmonar provenientes de indivíduos portadores de HIV. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 26, p. 41-42, 1994.

ANEXO A - Fórmulas

MÉTODO DIRETO

Solução fisiológica 0,85%

Cloreto de sódio.....	0,85g
Água destilada q.s.p.....	100ml

Corante de lugol

Iodo metálico (cristais).....	2g
Iodeto de potássio.....	4g
Água destilada q.s.p.....	100ml

MÉTODO DE FAUST

Solução de sulfato de zinco, densidade 1,18g/ml

Sulfato de zinco, cristais (ZnSO ₄).....	330g
Água destilada.....	670ml

A densidade é crítica, devendo ser ajustada com densímetro pela adição de sal ou de água.

MÉTODO DE SHEATERS

Solução saturada de açúcar

Açúcar cristal ou refinado.....	640g
Água destilada.....	500ml

Aquecer a água até o ponto de ebulição; adicionar o açúcar e homogeneizar com um bastão de vidro até a completa dissolução. Utilizando os componentes nas devidas proporções é possível que a densidade da solução fique próxima da esperada ($d=1,2$), porém é recomendado o uso de um densímetro para obter a densidade exata na temperatura de uso.

COLORAÇÃO DE AURAMINA O

Solução de auramina O

A: auramina O.....	0,1g
álcool etílico 95%.....	10ml
B: fenol liquefeito.....	3ml
água destilada.....	87ml

Misturar A + B e conservar em frasco âmbar à temperatura ambiente.

Solução álcool-ácido clorídrico 0,5%

Ácido clorídrico concentrado.....	0,5ml
Álcool etílico 70%.....	100ml

Solução de permanganato de potássio 0,5%

KMnO ₄	5g
Água destilada q.s.p.....	1.000ml

COLORAÇÃO DE KINYOUN

Fucsina carbólica de Kinyoun

Fucsina básica.....	4g
Cristais de fenol.....	8g
Álcool etílico 95%.....	20ml
Água destilada q.s.p.....	100ml

Solução álcool-ácido sulfúrico 5%

Ácido sulfúrico concentrado.....	5ml
Álcool etílico 70%.....	100ml

Solução de azul de metileno 1% ou verde malaquita a 2%

Azul de metileno.....	1g
Água destilada q.s.p.....	100ml

Cristais de verde malaquita.....	2g
Água destilada.....	100ml

Obs.: As soluções corantes devem ser filtradas antes do uso.

COLORAÇÃO DE ZIEHL NEELSEN MODIFICADO

Solução de fucsina de Ziehl Neelsen

A: Fucsina básica.....	0,3g
Álcool 95%.....	10ml
B: Fenol fundido.....	5g
Água destilada.....	95ml

Misturar a solução A com a solução B.

Solução de ácido sulfúrico 10%

Ácido sulfúrico.....	10ml
Água destilada q.s.p.....	100ml

COLORAÇÃO DE SAFRANINA

Solução de safranina 1%

Safranina.....	1g
Água destilada q.s.p.....	100ml

Solução de álcool ácido 3%

Ácido clorídrico concentrado.....	3ml
Álcool 95 % q.s.p.....	100ml

COLORAÇÃO DE AZUL DE METILENO DE NAIR**Solução de ácido acético glacial 0,2M (Solução A)**

Ácido acético glacial.....	12ml
Água destilada.....	1.000ml

Misturar ácido acético e água. Armazenar a solução até o momento do uso em frasco de vidro com tampa esmerilhada.

Solução de acetato de sódio 0,2M (Solução B)

Acetato de sódio anidro	16,4g
ou	
Acetato de sódio cristais.....	27,2g
Água destilada.....	1.000ml

Dissolver o acetato de sódio em 400ml de água. Completar o volume. Armazenar a solução até o momento do uso em um frasco de vidro com tampa esmerilhada.

Solução tampão de acetato 0,2M (pH 3,6)

Solução A.....	46,3ml
Solução B.....	3,7ml

Misturar as soluções A e B nos volumes indicados. Completar o volume até 100 ml com água destilada.

Solução corante

Azul de metileno.....	0,06g
Solução tampão de acetato 0,2M.....	100ml

Dissolver o azul de metileno em 100ml da solução tampão de acetato 0,2M.

COLORAÇÃO TRICRÔMICA**Solução de corante chromotrope**

Chromotrope 2R.....	6g
Fast green.....	0,15g
Ácido fosfotúngstico.....	0,7g
Ácido acético.....	3ml
Água destilada.....	100ml

Solução álcool-ácida

Ácido acético.....	4,5ml
Álcool etílico 90% q.s.p.....	100ml

COLORAÇÃO DE AZUL DE TOLUIDINA O**Solução fluidificante**

Fluimicil.....	1 ampola
Água destilada.....	100ml

Reagente sulfatado

Ácido acético glacial.....	135ml
Ácido sulfúrico não fumegante.....	45ml

Observação: este reagente deverá ser preparado no momento do uso em jarra de Coplin, dentro de recipiente contendo água gelada.

Solução de azul de toluidina O

Azul de toluidina O	1,5g
Água destilada.....	300ml
Ácido clorídrico concentrado.....	10ml
Álcool etílico absoluto.....	700ml

CONSERVANTES

Solução tamponada formalina 10%

Formol comercial.....	10ml
PBS, pH 7,2-7,4; 0,01M.....	90ml

Solução tampão fosfato (*Phosphate Buffered Solution*) PBS, pH 7,2-7,4; 0,01M

Na ₂ HPO ₄ ·1H ₂ O.....	3,56g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O.....	0,94g
NaCl.....	16,34g
H ₂ O destilada q.s.p.....	2.000ml

Solução de acetato de sódio, ácido acético e formol

Acetato de sódio.....	15g
Ácido acético	20ml
Formalina.....	40ml
Água destilada q.s.p.....	1.000ml

Solução de bicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) a 2,5%

Bicromato de potássio	2,5g
Água destilada q.s.p.....	1.000ml

ANEXO B - Medição de estruturas microscópicas

Para medição de estruturas no microscópio óptico comum é necessário o uso de ocular e lâmina micrométricos. Com auxílio desse conjunto, é possível calcular os fatores de correção para todos os aumentos de um mesmo microscópio. A ocular micrométrica consiste em uma escala graduada, sem valor de medida, disposta sobre a lente de uma ocular. O conjunto (escala e lente) move-se por rotação, permitindo coincidir um risco da escala com as margens da estrutura que se deseja medir. Já a lâmina micrométrica apresenta escala de precisão com valor total de 1mm de comprimento dividida em 100 partes, cada uma equivalente a 0,01mm ou 10 μ m. Observe as figuras a seguir.



Figura 1 – Ocular do microscópio, mostrando o conjunto (escala e lente)
Fonte: García-Zapata; Souza Jr. - IPTSP, 2010

A escala é constituída por 100 divisões

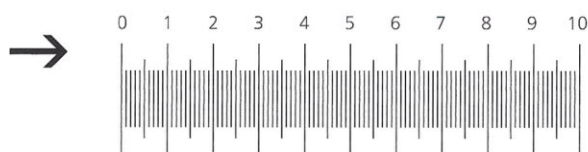


Figura 2 – Detalhe da escala, sem valor de medida, da ocular micrométrica
Fonte: García-Zapata; Souza Jr. - IPTSP, 2010



Figura 3 – Lâmina micrométrica de precisão de 1mm, com 100 divisões
Fonte: Garcia-Zapata; Souza Jr. - IPTSP, 2010



Figura 4 – Detalhe da escala de precisão observada com a objetiva de menor aumento
Fonte: Pinto PLS, 2010

A calibração do microscópio consiste em calcular, para cada objetiva, o valor em micrômetro de cada unidade da escala da ocular micrométrica.

Procedimentos para o cálculo dos fatores de correção:

- Substituir a ocular própria do microscópio por uma micrométrica.
- Sobre a mesa de platina do microscópio, colocar a lâmina micrométrica.
- Mover a mesa de platina, fazendo coincidir a margem de uma linha da ocular micrométrica com uma linha da lâmina micrométrica;
- Observar com atenção quais são as linhas dos dois retículos (ocular e lâmina) que coincidem e calcular o fator correspondente.

Obtém-se as medidas de uma estrutura no campo microscópico alinhando as margens desta com os limites da escala da ocular micrométrica e conta-se o número de divisões contidas entre as margens. Esse número multiplicado pelo fator representa o valor em micrômetros da estrutura de um dado aumento.

ANEXO C - Diagnóstico morfológico dos agentes oportunistas (guia ilustrado)

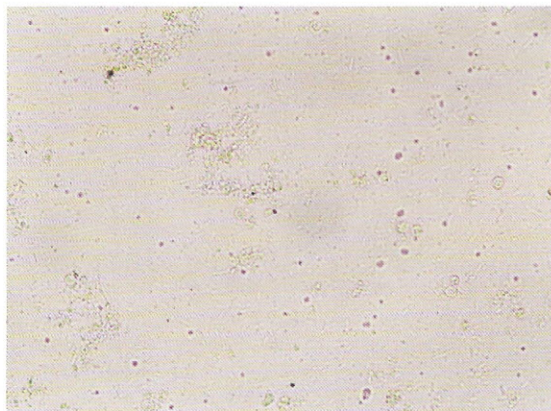


Figura 1 – Preparação de fezes a fresco mostrando três oocistos de *Cryptosporidium* spp. Observe que as estruturas são pequenas e refringentes – 400x

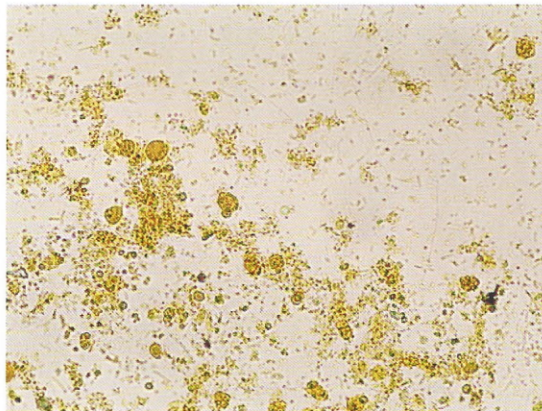


Figura 2 – Preparação de fezes corada pelo lugol mostrando um oocisto de *Cryptosporidium* spp ao centro não corado e refringente – 400x

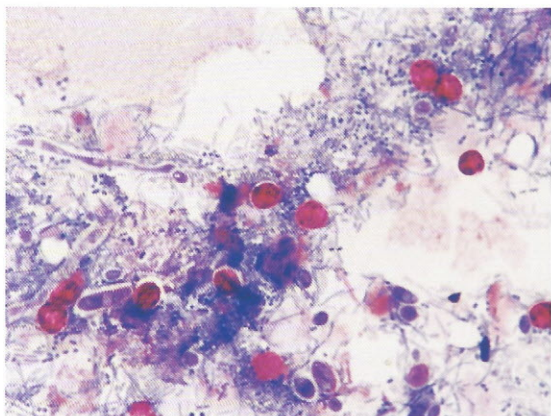


Figura 3 – Esfregaço de fezes corado pelo método de Kinyoun mostrando vários oocistos de *Cryptosporidium* spp corados em vermelho. Note que o oocisto central apresenta um ponto escuro (corpo residual) e estruturas internas em meia lua (esporozoítos) – 1.000x

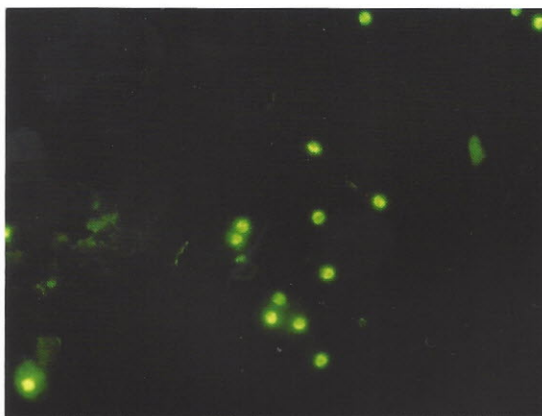


Figura 4 – Esfregaço de fezes corado pelo método da auramina O mostrando vários oocistos de *Cryptosporidium* spp corados em verde fluorescente. Note que não há diferenciação das estruturas internas – 400x

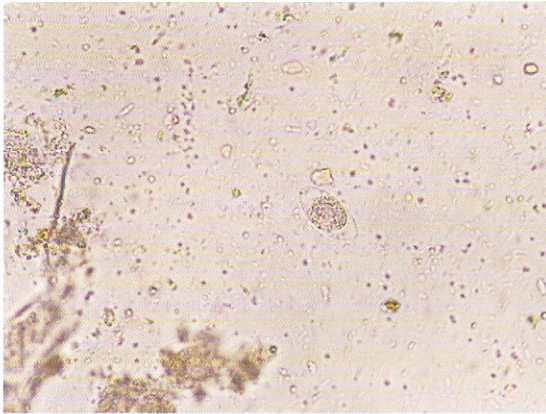


Figura 5 – Preparação de fezes a fresco mostrando oocisto de *Isospora belli* com um esporoblasto. Observe a membrana delgada de forma elíptica e massa central única com aspecto granuloso (esporoblasto) – 400x

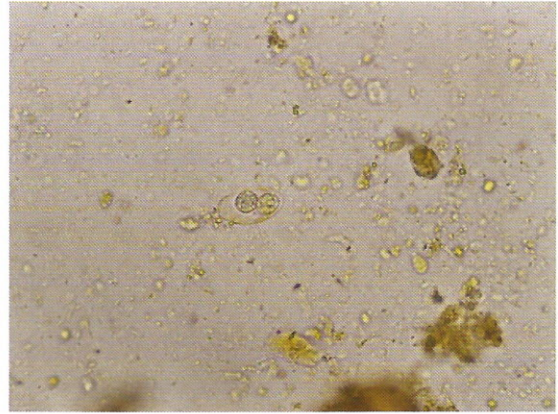


Figura 6 – Preparação de fezes a fresco mostrando oocisto de *Isospora belli* com dois esporoblastos. Observe a membrana delgada de forma elíptica e duas massas com aspecto granuloso (esporoblastos) – 400x

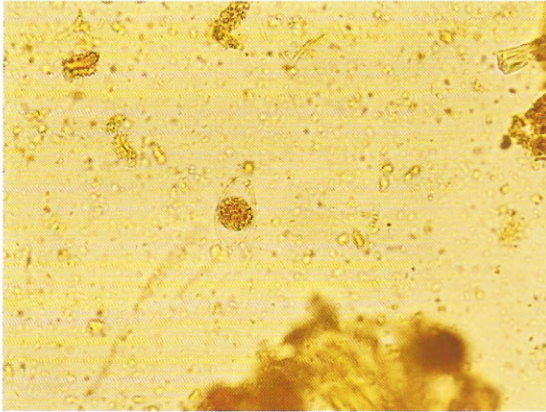


Figura 7 – Preparação de fezes corada pelo lugol mostrando ao centro oocisto de *Isospora belli* com um esporoblasto. Observe a membrana delgada de forma elíptica pouco corada e esporoblasto com aspecto granuloso visivelmente corado – 400x

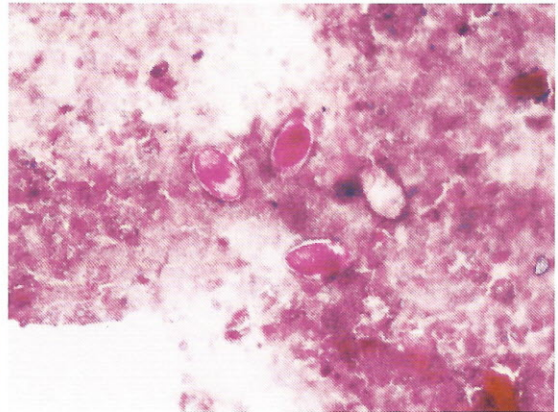


Figura 8 – Esfregaço de fezes corado pelo método de Kinyoun mostrando três oocistos de *Isospora belli* corados em vermelho. Note que não há diferenciação das estruturas internas – 400x

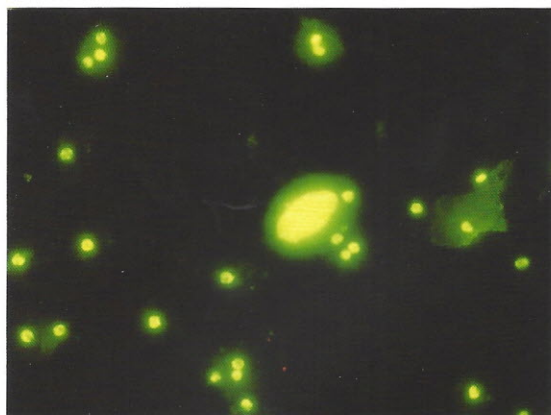


Figura 9 – Esfregaço de fezes corado pelo método da auramina O mostrando um oocisto central verde fluorescente de *Isospora belli* e vários oocistos de *Cryptosporidium* spp também fluorescentes. Note que não há diferenciação das estruturas internas devido à intensidade da coloração – 400x

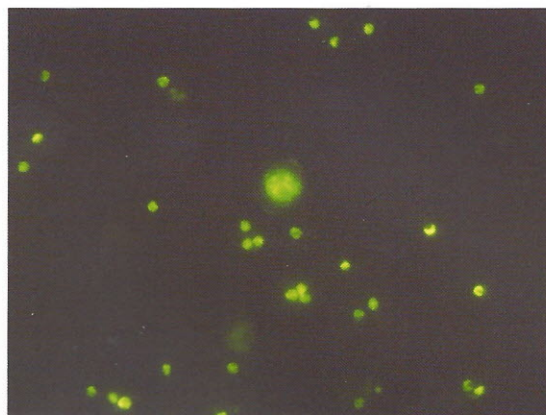


Figura 10 – Esfregaço de fezes corado pelo método da auramina O mostrando um oocisto central verde fluorescente de *Isospora belli* e vários oocistos de *Cryptosporidium* spp também fluorescentes. Note que a coloração está menos intensa que na figura anterior. A membrana do oocisto de *Isospora belli* está fracamente corada e o esporoblasto se apresenta como massa granulosa e bem definido – 400x

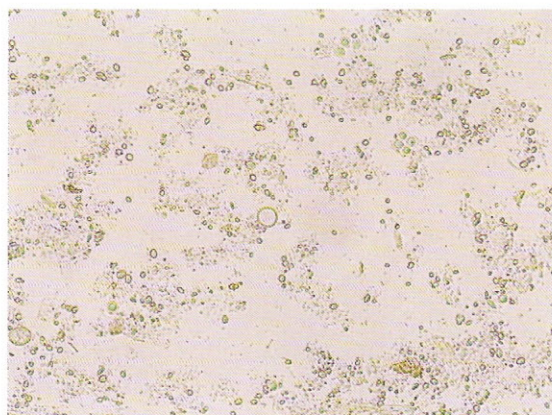


Figura 11 – Preparação de fezes a fresco mostrando ao centro oocisto de *Cyclospora cayetanensis*. O oocisto imaturo apresenta membrana delgada e um esporoblasto. Note que não há espaço entre a membrana externa e a do esporoblasto, conferindo um aspecto de membrana espessa – 400x

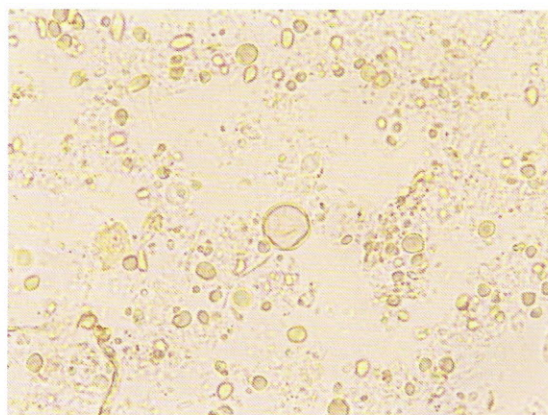


Figura 12 – Preparação de fezes a fresco mostrando ao centro oocisto de *Cyclospora cayetanensis*. Em maior aumento, é possível distinguir a membrana externa do oocisto da interna do esporoblasto – 1.000x

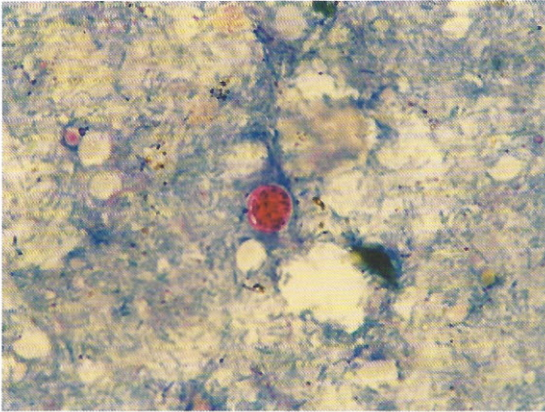


Figura 13 – Esfregaço de fezes corado pelo método de Kinyoun mostrando um oocisto ao centro de *Cyclospora cayetanensis* corado em vermelho. Note que o oocisto imaturo apresenta nesta coloração aspecto característico interno lembrando uma amora, não havendo diferenciação das estruturas internas – 1.000x

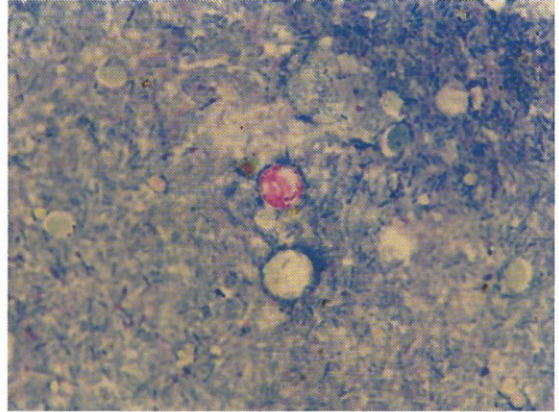


Figura 14 – Esfregaço de fezes corado pelo método de Kinyoun mostrando dois oocistos de *Cyclospora cayetanensis*. O oocisto de cima está corado em vermelho claro sem apresentar aspecto característico de amora. O oocisto de baixo não está corado (forma "fantasma"). Este problema é frequentemente observado em preparações coradas pelo método de Kinyoun – 1.000x

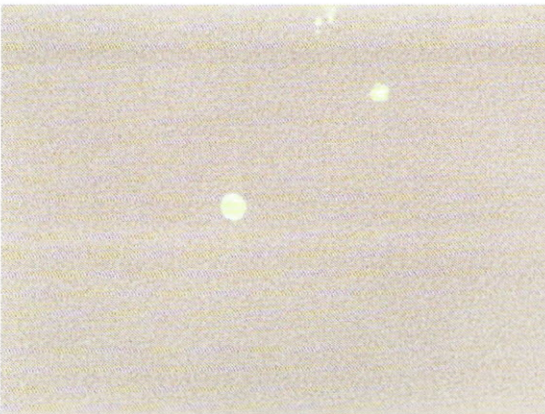


Figura 15 – Esfregaço de fezes corado pelo método da auramina O mostrando um oocisto central verde fluorescente de *Cyclospora cayetanensis*. Note que não há diferenciação das estruturas internas – 400x

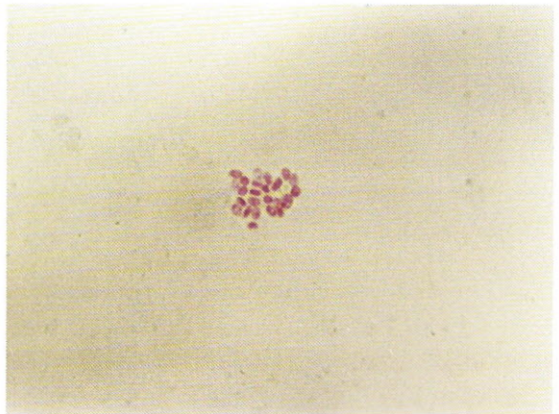


Figura 16 – Esfregaço de cultura corado pelo tricrômio mostrando vários esporos de *Encephalitozoon cuniculi*. Note os esporos de forma oval e agrupados, formando grumos. Internamente, é possível distinguir duas regiões. A mais condensada (escura), representada pelo núcleo, e a clara, pelo vacúolo – 1.000x

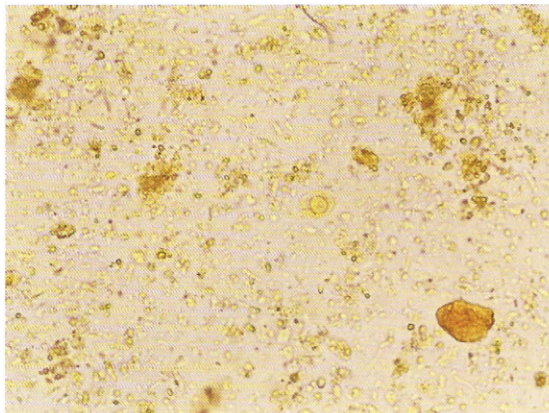


Figura 17 – Preparação de fezes corada pelo lugol mostrando ao centro forma vacuolar de *Blastocystis hominis*. Observe a membrana delgada de forma subesférica, vacúolo evidente ocupando posição central e vários núcleos deslocados lateralmente – 400x

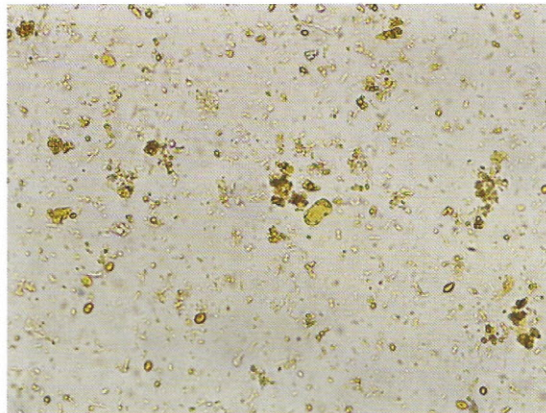


Figura 18 – Preparação de fezes corada pelo lugol mostrando ao centro forma vacuolar de *Blastocystis hominis*. Observe a membrana delgada de forma alongada. Neste caso, o vacúolo não está evidente. Note vários núcleos deslocados lateralmente – 400x

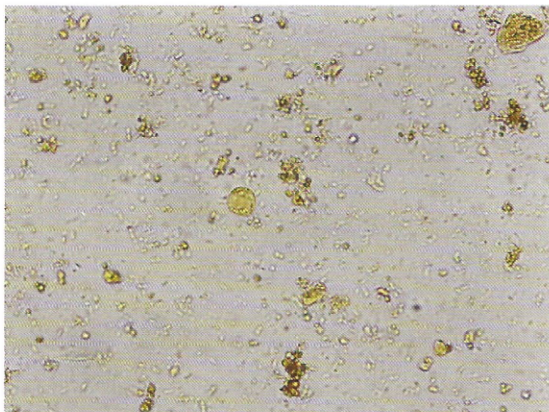


Figura 19 – Preparação de fezes corada pelo lugol mostrando ao centro forma multinuclear de *Blastocystis hominis*. Observe a forma esférica, lembrando um leucócito. Note vários núcleos internos distribuídos homogeneamente – 400x

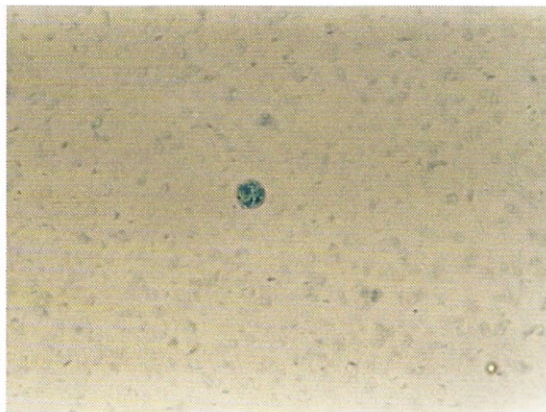


Figura 20 – Preparação de fezes corada pelo azul de metileno de Nair mostrando ao centro forma multinuclear de *Blastocystis hominis*. Observe a forma esférica e vários núcleos internos distribuídos homogeneamente. Esta coloração permite o diagnóstico diferencial com leucócito – 400x



Figura 21 – Larva rabditoide de *Strongyloides stercoralis* corada pelo lugol. Observe o esôfago rabditoide ocupando um terço do comprimento da larva, dividido em corpo, istmo e bulbo. Primórdio genital situado na porção média do corpo. Cauda com ponta fina – 200x



Figura 22 – Larva filarioide de *Strongyloides stercoralis* corada pelo lugol. Observe o esôfago filarioide reto e longo sem vestibulo bucal, ocupando cerca da metade do comprimento da larva. Cauda com entalhe – 200x



Figura 23 – Larva filarioide de *Strongyloides stercoralis* corada pelo lugol. Detalhe da cauda com entalhe – 400x

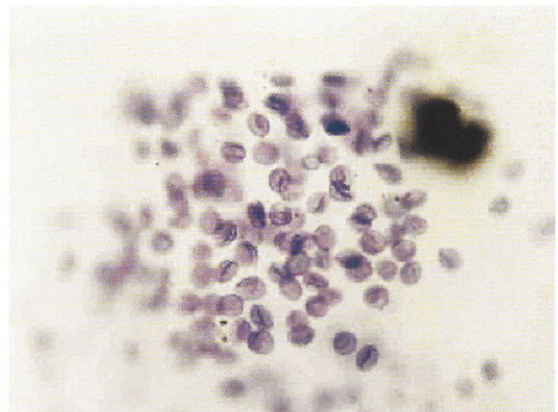


Figura 24 – Esfregaço de lavado broncoalveolar corado pelo azul de toluidina O, mostrando vários cistos de *Pneumocystis jirovecii*. Observe que somente as paredes dos cistos estão coradas e que estas formam grumos. Raramente os cistos aparecem isolados – 1.000x

ANEXO D - Normas de organização e funcionamento do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública – Sislab

A Portaria nº 3.252, de 22 de dezembro de 2009, do Ministério da Saúde-MS, aprova as diretrizes para execução e financiamento das ações de Vigilância em Saúde pela União, Estados, Distrito Federal e Municípios e dá outras providências.

A Portaria MS nº 2.031, de 23 de setembro de 2004, dispõe sobre a organização do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública.

O Sislab é um conjunto de redes nacionais de laboratórios, organizadas em sub-redes, por agravos ou programas, de forma hierarquizada por grau de complexidade das atividades relacionadas à vigilância em saúde, compreendendo vigilância epidemiológica, vigilância ambiental em saúde, vigilância sanitária e assistência médica.

É, portanto, constituído pelas seguintes redes nacionais de laboratórios:

- Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Epidemiológica;
- Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Ambiental em Saúde;
- Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária; e
- Rede Nacional de Laboratórios de Assistência Médica de Alta Complexidade.

As sub-redes são estruturadas, observadas suas especificidades, de acordo com a seguinte classificação de unidades laboratoriais:

- Centros Colaboradores – CC;
- Laboratório de Referência Nacional – LRN;
- Laboratório de Referência Regional – LRR;
- Laboratório de Referência Estadual – LRE;
- Laboratório de Referência Municipal – LRM;
- Laboratórios Locais – LL; e
- Laboratórios de Fronteira – LF.

Em um País continental, como o Brasil, essa estruturação é fundamental para que as ações e os serviços laboratoriais executados pelos laboratórios de saúde pública sejam abrangentes, organizados, racionais e em consonância com os princípios do SUS.

As competências dessas unidades laboratoriais estão estabelecidas na Portaria nº 2.031, anteriormente citada.

Os Laboratórios de Referência Regional são unidades laboratoriais capacitadas a desenvolver atividades mais complexas, organizadas por agravos ou programas, que prestam apoio técnico-operacional àquelas unidades definidas para sua área geográfica de abrangência.

Essas duas unidades laboratoriais são oficialmente definidas pelo MS.

Os Laboratórios de Referência Estadual são os Laboratórios Centrais de Saúde Pública – Lacen, vinculados às secretarias estaduais de saúde, com área geográfica de abrangência estadual.

Os Laboratórios de Referência Municipal são unidades laboratoriais vinculadas às secretarias municipais de saúde, com área geográfica de abrangência municipal.

Os Laboratórios Locais são unidades laboratoriais que integram a rede estadual ou municipal de laboratórios de saúde pública.

Os Laboratórios de Fronteira são unidades laboratoriais localizadas em regiões limítrofes do País.

No capítulo III da Portaria nº 2.031, é definida a gestão do sistema. As redes nacionais de laboratórios de vigilância epidemiológica e ambiental em saúde têm como gestora nacional a Secretaria de Vigilância em Saúde do MS.

COORDENAÇÃO GERAL DE LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA – CGLAB

A Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública, vinculada à Secretaria de Vigilância em Saúde, é responsável por coordenar, normalizar e supervisionar as atividades técnicas das redes nacionais de laboratórios de vigilância epidemiológica e ambiental em saúde. A CGLab tem como metas promover, coordenar, apoiar e fomentar ações, objetivando a melhoria contínua dos serviços prestados por essas redes. Nesse sentido, a elaboração de manuais técnicos com a definição das metodologias, das orientações e dos procedimentos que devem ser seguidos pelos laboratórios é de grande importância para a confiabilidade e a qualidade dos resultados e dos trabalhos gerados pelos laboratórios, já que estes têm implicações clínico-terapêuticas e epidemiológicas para o paciente e a sociedade.

ANEXO E - Relação dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública – Lacen

ACRE

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública
Dr. Djalma da Cunha Batista
Endereço: Av. Getúlio Vargas – Travessa do Hemoacre, s/nº
CEP: 69900-614 – Rio Branco/AC
Telefones: (68) 3228-2720
Fax: (68) 3228-2720
E-mail: lacen.saude@ac.gov.br

AMAPÁ

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública Prof.
Reinaldo Damasceno
Endereço: Rua Trancredo Neves, 1.118 – São Lázaro
CEP: 68900-010 – Macapá/AP
Telefones: (96) 3212-6175/6165/6115
Fax: (96) 3212-6115
E-mail: diretoria@lacen.ap.gov.br

BAHIA

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública Prof.
Gonçalo Moniz
Endereço: Rua Waldemar Falcão, 123 – Brotas
CEP: 40295-001 – Salvador/BA
Telefones: (71) 3376-1414/2299
Fax: (71) 3356-0139
E-mail: lacen.diretoria@saude.ba.gov.br

DISTRITO FEDERAL

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública
Endereço: SGAN, Quadra 601, lotes O e P
CEP: 70830-010 – Brasília/DF
Telefones: (61) 3325-5288/3316-9808 (Centro de Controle de Zoonoses)
Fax: (61) 3321-9995 / 3326-5769
E-mail: gablacen@saude.df.gov.br

GOIÁS

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública
Dr. Giovanni Cysneiros
Endereço: Av. Contorno, 3.556 – Jardim Bela Vista
CEP: 74853-120 – Goiânia/GO
Telefones: (62) 3201-8890/3888
Fax: (62) 3201-3888
E-mail: lacen@saude.go.gov.br
lacen.dirgeral@saude.go.gov.br

ALAGOAS

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública
Dr. Aristeu Lopes
Endereço: Av. Marechal Castelo Branco, 1.773 – Jatiúca
CEP: 57036-340 – Maceió/AL
Telefones: (82) 3315-2702/2701
Fax: (82) 3315-2722
E-mail: coordenação@lacen.com.br/telma@lacen.com.br

AMAZONAS

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública
Endereço: Rua Emílio Moreira, 510 – Centro
CEP: 69020-040 – Manaus/AM
Telefones: (92) 3622-2819/2129-4000
Fax: (92) 2129-4000
E-mail: lacenam@bol.com.br

CEARÁ

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública
Endereço: Av. Barão de Studart, 2.405 – Aldeota
CEP: 60120-002 – Fortaleza/CE
Telefones: (85) 3101-1472/1491
Fax: (85) 3101-1485
E-mail: ricardo@saude.ce.gov.br

ESPÍRITO SANTO

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública
Endereço: Av. Marechal Mascarenhas de Moraes,
2.025 – Bento Ferreira
CEP: 29052-121 – Vitória/ES
Telefones: (27) 3382-5046
Fax: (27) 3137-2404
E-mail: lacen@saude.es.gov.br

MARANHÃO

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública –
Instituto Oswaldo Cruz
Endereço: Rua Afonso Pena, 198 – Centro
CEP: 65010-030 – São Luís/MA
Telefones: (98) 3232-3410/5356
Fax: (98) 3232-3410 ramais: 239 ou 237
E-mail: lacen@lacen.ma.gov.br

MATO GROSSO

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública
Endereço: Rua Thogo da Silva Pereira, 63 – Centro
CEP: 78020-500 – Cuiabá/MT
Telefones: (65) 3623-6404/3624-6095
Fax: (65) 3613-2697
E-mail: dirlacen@saude.mt.gov.br

MINAS GERAIS

Instituição: Instituto Octávio Magalhães/Fundação Ezequiel Dias
Endereço: Rua Conde Pereira Carneiro, 80 – Gameleira
CEP: 30510-010 – Belo Horizonte/MG
Telefones: (31) 3371-9472/9461/9478
Fax: (31) 3371-9480/9478/9444
E-mail: iomlacen@funed.mg.gov.br

PARAÍBA

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública
Endereço: Av. Cruz das Armas, s/nº – Cruz das Armas
CEP: 58085-000 – João Pessoa/PB
Telefones: (83) 3218-5926/5922
Fax: (83) 3218-5923
E-mail: lacenpb@ig.com.br

PERNAMBUCO

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Milton Bezerra Sobral
Laboratório de Endemias – Labend
Endereço: Av. Conde da Boa Vista, 1.570 – Boa Vista
CEP: 50060-001 – Recife/PE
Telefones: (81) 3412-6416/6417
Fax: (81) 3412-6333
E-mail: lacen@saude.pe.gov.br

RIO DE JANEIRO

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública Noel Nutels
Endereço: Rua do Resende, 118 – Bairro de Fátima
CEP: 20231-092 – Rio de Janeiro/RJ
Telefones: (21) 2252-4000
Telefax: (21) 2232-5767/2470
E-mail: dptnnutels@saude.rj.gov.br

RIO GRANDE DO SUL

Instituição: Laboratório Central do Estado
Endereço: Av. Ipiranga, 5.400 – Jardim Botânico
CEP: 90610-000 – Porto Alegre/RS
Telefones: (51) 3288-4035/3352-0416
Fax: (51) 3288-4053
E-mail: lacen@fepps.rs.gov.br

MATO GROSSO DO SUL

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública
Endereço: Av. Senador Felinto Muller, 1.666 – Ipiranga
CEP: 79074-460 – Campo Grande/MS
Telefones: (67) 3345-1300/3346-4871
Fax: (67) 3345-1320
E-mail: lacendiretoria@net.ms.gov.br

PARÁ

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública
Endereço: Rodovia Augusto Montenegro, Km 10
CEP: 66823-060 – Belém/PA
Telefones: (91) 3248-8299/1766
E-mail: lacen@sespa.pa.gov.br

PARANÁ

Instituição: Laboratório Central do Estado
Endereço: Rua Sebastiana Santana Fraga, 1.001 – Guatupê
CEP: 83060-500 – São José dos Pinhais/PR
Telefones: (41) 3299-3200/3218/3219
Fax: (41) 3299-3204
E-mail: lacen@pr.gov.br/diretorialacen@sesa.pr.gov.br

PIAUI

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Costa Alvarenga
Endereço: Rua Dezenove de Novembro, 1.945 – Primavera
CEP: 64002-570 – Teresina/PI
Telefones: (86) 3223-2484/3221-3551
Fax: (86) 3216-3651
E-mail: lacempi@veloxmail.com.br

RIO GRANDE DO NORTE

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública
Endereço: Rua Cônego Monte, s/nº – Quintas
CEP: 59037-170 – Natal/RN
Telefones: (84) 3232-6191
Fax: (84) 3232-6195
E-mail: lacen@rn.ig.com.br/lacenrn@yahoo.com.br

RONDÔNIA

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública
Endereço: Rua Anita Garibaldi, 4.130 – Costa e Silva
CEP: 78903-770 – Porto Velho/RO
Telefones: (69) 3216-5305/5300/5301/5302
Fax: (69) 3216-6149/6106 ou 3223-4890 ou 2339-6566
E-mail: direcao@lacen.ro.gov.br

RORAIMA

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública
Endereço: Av. Brigadeiro Eduardo Gomes, s/nº – Novo Planalto
CEP: 69305-650 – Boa Vista/RR
Telefone: (95) 3623-2996/1982/1221
Fax: (95) 3223-1976/1294 (Secretaria de Saúde)
E-mail: lacen_rr@yahoo.com.br

SANTA CATARINA

Instituição: Laboratório Central de Saúde Pública
Endereço: Av. Rio Branco, 172, fundos – Centro
CEP: 88015-201 – Florianópolis/SC
Telefones: (48) 3251-7801/7800/7813/7817/7802
Fax: (48) 3251-7900
E-mail: lacen@saude.sc.gov.br

TOCANTINS

Instituição: Laboratório Central de Referência em Saúde Pública
Endereço: 601 Sul, Av. LO 15, Conjunto 2, Lote 1 – Planalto Diretor Sul
CEP: 77054-970 – Palmas/TO
Telefones: (63) 3218-3237/3239/3223
Fax: (63) 3218-3220/3228
E-mail: lacen@saude.to.gov.br

SÃO PAULO

Instituição: Instituto Adolf Lutz
Endereço: Av. Dr. Arnaldo, 355 – Cerqueira César
CEP: 01246-902 – São Paulo/SP
Telefones: (11) 3068-2800/2802
Fax: (11) 3085-3505/3088-3041
E-mail: expedientedg@ial.sp.gov.br

SERGIPE

Instituição: Instituto Parreiras Horta
Endereço: Rua Campo do Brito, 551 – São José
CEP: 49020-380 – Aracaju/SE
Telefone: (79) 3234-6000
Fax: (79) 3214-1863
E-mail: gpresi@hemolacem.se.gov.br



Ouvidoria SUS
136

Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde
www.saude.gov.br/bvs

Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde
www.saude.gov.br/svs



Secretaria de
Vigilância em Saúde

Ministério da
Saúde

