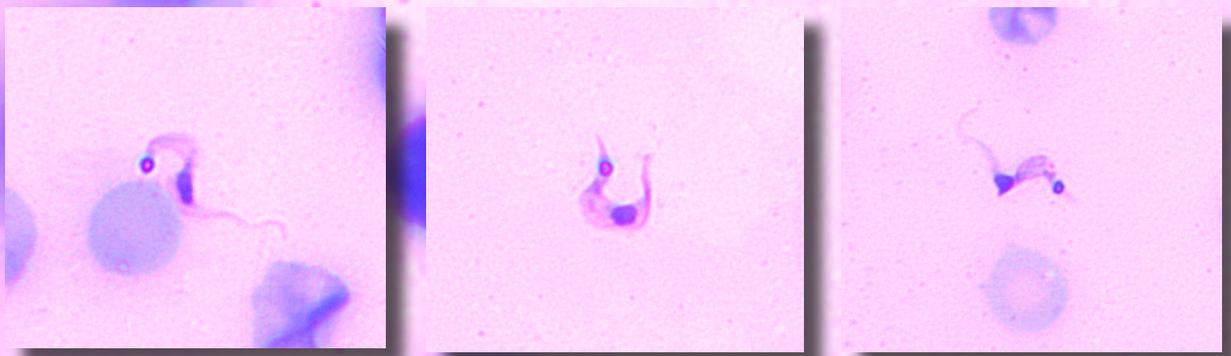


Pranchas para o Diagnóstico Microscópico da Doença de Chagas



OPAS



Organização
Pan-Americana
da Saúde



Organização
Mundial da Saúde
ESCRITÓRIO REGIONAL PARA AS
Américas

Pranchas para o Diagnóstico Microscópico da Doença de Chagas

ISBN: 978-92-75-72768-3 (PDF)

ISBN: 978-92-75-22768-8 (versão impressa)

© **Organização Pan-Americana da Saúde e Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, 2023**



Alguns direitos reservados. Esta obra está disponível nos termos da licença Atribuição-NãoComercial-Compartilhável 3.0 IGO da Creative Commons (CC BY-NC-SA 3.0 IGO).

De acordo com os termos desta licença, esta obra pode ser copiada, redistribuída e adaptada para fins não comerciais, desde que a nova obra seja publicada com a mesma licença Creative Commons, ou equivalente, e com a referência bibliográfica adequada, como indicado abaixo. Em nenhuma circunstância deve-se dar a entender que a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD/AM) endossam uma determinada organização, produto ou serviço. O uso do logotipo da OPAS e FMT-HVD/AM não é autorizada.

Adaptações: No caso de adaptação desta obra, o seguinte termo de isenção de responsabilidade deve ser adicionado à referência bibliográfica sugerida: “Esta é uma adaptação de uma obra original da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD/AM). As perspectivas e opiniões expressadas na adaptação são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não têm o endosso da OPAS”.

Traduções: No caso de tradução desta obra, o seguinte termo de isenção de responsabilidade deve ser adicionado à referência bibliográfica sugerida: “Esta tradução não foi elaborada pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD/AM). A OPAS e FMT-HVD/AM não são responsáveis pelo conteúdo ou rigor desta tradução”.

Citação sugerida: Pranchas para o Diagnóstico Microscópico da Doença de Chagas. Brasília, DF: Organização Pan-Americana da Saúde OPAS e Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD/AM); 2023. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: <https://doi.org/10.37774/9789275727683>.

Dados de catalogação: podem ser consultados em: <http://iris.paho.org>.

Direitos e licenças: Para solicitações de uso comercial e consultas sobre direitos e licenças, ver www.paho.org/es/publicaciones/permisos-licencias.

Materiais de terceiros: Para a utilização de materiais nesta obra atribuídos a terceiros, como tabelas, figuras ou imagens, cabe ao usuário a responsabilidade de determinar a necessidade de autorização e de obtê-la devidamente do titular dos direitos autorais. O risco de indenização decorrente do uso irregular de qualquer material ou componente da autoria de terceiros recai exclusivamente sobre o usuário.

Termo geral de isenção de responsabilidade. As denominações utilizadas e a maneira de apresentar o material nesta publicação não manifestam nenhuma opinião por parte da OPAS e FMT-HVD/AM com respeito ao estatuto jurídico de qualquer país, território, cidade ou área, ou de suas autoridades, nem tampouco à demarcação de suas fronteiras ou limites. As linhas pontilhadas e tracejadas nos mapas representam as fronteiras aproximadas para as quais pode ainda não haver acordo definitivo.

A menção a determinadas empresas ou a produtos de certos fabricantes não implica que sejam endossados ou recomendados pela OPAS e FMT-HVD/AM em detrimento de outros de natureza semelhante não mencionados. Salvo erros ou omissões, os nomes de produtos patenteados são redigidos com a inicial maiúscula.

A OPAS e FMT-HVD/AM adotaram todas as precauções razoáveis para verificar as informações constantes desta publicação. No entanto, o material publicado está sendo distribuído sem nenhum tipo de garantia, seja expressa ou implícita. A responsabilidade pela interpretação e uso do material recai sobre o leitor. Em nenhum caso a OPAS e/ou a FMT-HVD/AM serão responsáveis por prejuízos decorrentes de sua utilização.

BRA/CDE/2023

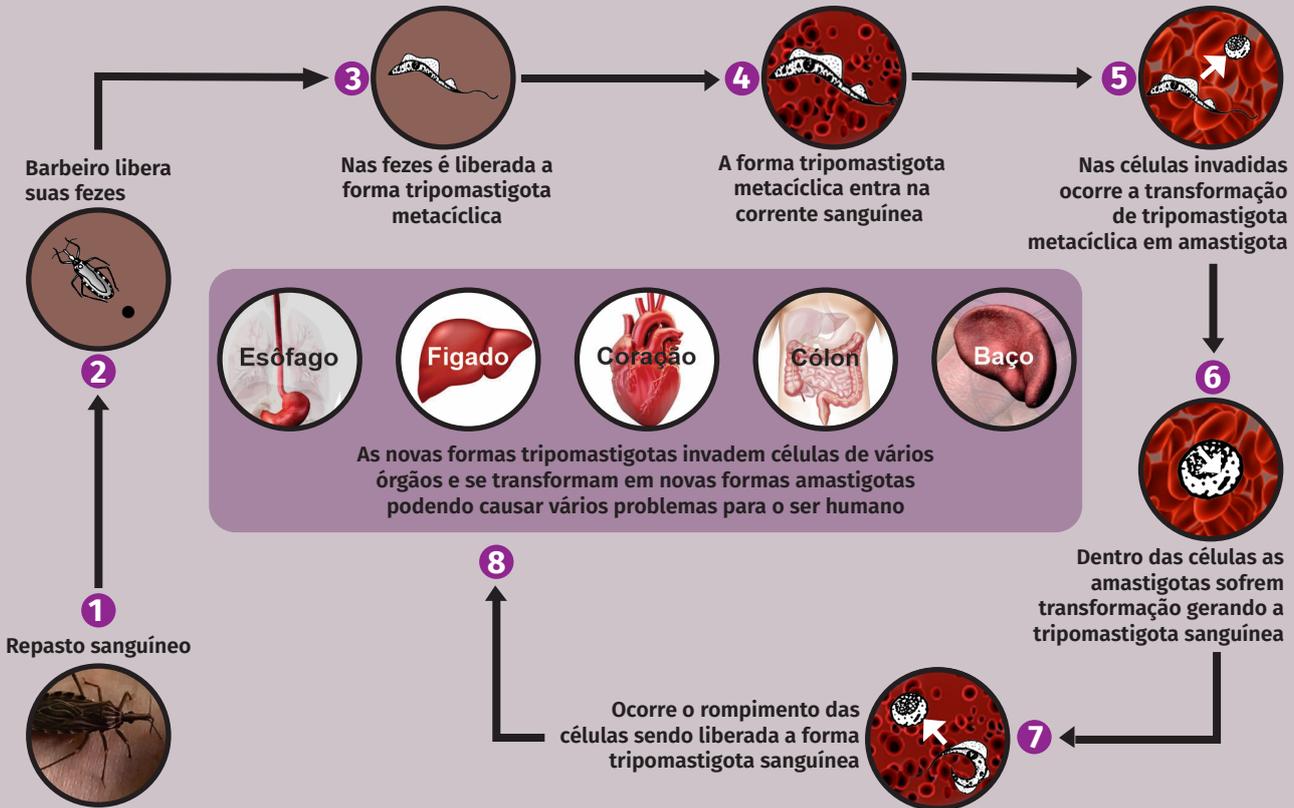
Sumário

Sumário	Prancha 1A
Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	Prancha 1B
Introdução	Prancha 2A
Elementos figurados contaminantes	Prancha 2B
A doença de Chagas e sua transmissão	Prancha 3A
Imagens de hemoparasitos	Prancha 3B
Biossegurança	Prancha 4A
<i>Trypanosoma cruzi</i> : Morfologia	Prancha 4B
Gota espessa 1: Formas flageladas: tripomastigota sanguíneo	Prancha 5A
Procedimentos para pesquisa direta das formas flageladas	Prancha 5B
Gota espessa 2: Formas flageladas: tripomastigota sanguíneo	Prancha 6A
Confecção de gota espessa	Prancha 6B
Confecção de gota espessa e esfregota na mesma lâmina	Prancha 7A
Esfregaço <i>T. cruzi</i> - Pacientes com DCA	Prancha 7B
Métodos de Coloração - Gota espessa e esfregaço	Prancha 8A
Gota espessa 3: Formas flageladas: tripomastigota sanguíneo	Prancha 8B
Erros comuns na confecção do esfregaço sanguíneo	Prancha 9A
Materiais e equipamentos necessários	Prancha 9B
Referências Bibliográficas	Prancha 10A

Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*

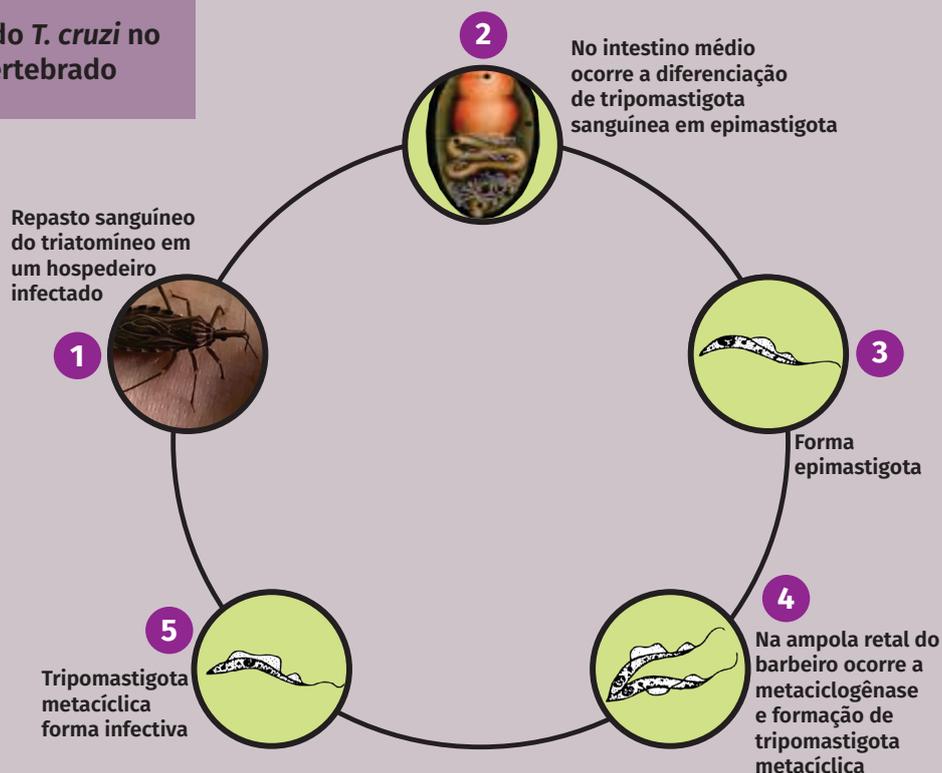
O ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* é realizado em dezenas de espécies de mamíferos, denominados de hospedeiros vertebrados (reservatórios), tais como, roedores, marsupiais, edentados, primatas como por exemplo o homem, e hospedeiros invertebrados, os insetos triatomíneos.

Ciclo biológico *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro vertebrado (homem, animais domésticos e animais silvestres)



Adaptado de Romulo Freire Morais, 2021

Ciclo biológico do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado



Adaptado de Romulo Freire Morais, 2021

Introdução

As pranchas para o diagnóstico parasitológico da doença de Chagas (DC) servem como guia para laboratoristas e técnicos de campo responsáveis pelo diagnóstico parasitológico da malária que, de forma integrada, sejam capazes de identificar os parasitas responsáveis pela doença de Chagas, através de imagens observadas no microscópio óptico. Este material também pode ser útil a professores e alunos de disciplinas correlatas.

As pranchas mostram imagens de fotos coloridas capturadas na observação de lâminas de sangue coradas e preparadas pelos métodos de esfregaço, gota espessa e “esfregota”. Inclui texto explicativo sobre o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença, incluindo descrições e instruções sobre o preparo e procedimentos para o exame de lâminas nos diferentes métodos de coloração (Giemsa e panótico), bem como do uso de

soluções tampão; inclui ainda imagens de outros parasitos que podem ser observados no exame da lâmina e outros elementos celulares observados no sangue, como contaminantes comuns em esfregaços de sangue periférico; e também boas práticas de biossegurança para o manuseio de amostras de sangue.

Para facilitar a consulta, as pranchas e o texto que as acompanham estão organizados seguindo a rotina usual de um laboratório. São incluídas imagens de *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli*, *Wuchereria bancrofti*, *Mansonella* sp, *Plasmodium* spp. e de elementos figurados, que podem estar presentes na amostra coletada. As imagens de *T. cruzi* e *T. rangeli*, foram adquiridas a partir de lâminas confeccionadas com material de sangue de paciente com DC e de material semeado e mantido em cultura oriundo de sangue humano e conteúdo intestinal de triatomíneos.

IMPORTANTE

O diagnóstico parasitológico confirmatório da fase aguda da doença de Chagas é realizado pela visualização de formas tripomastigotas do *T. cruzi*.

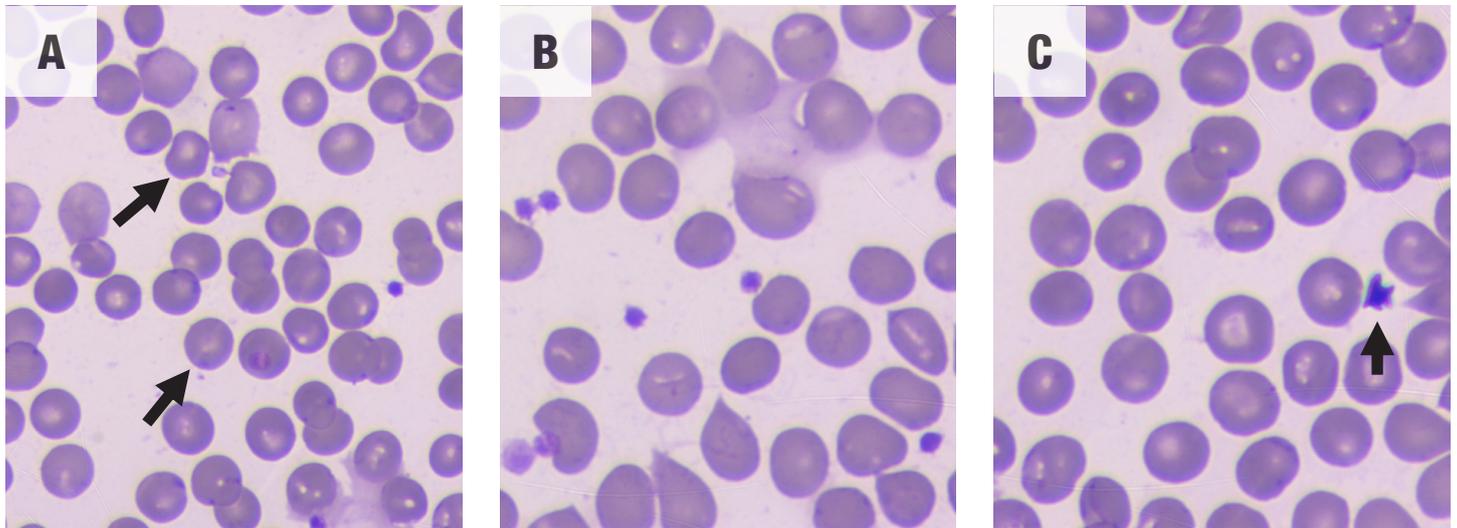
- A confirmação deste diagnóstico deve considerar aspectos clínicos e epidemiológicos da doença.
 - A confirmação do diagnóstico parasitológico deve ser realizada por um microscopista experiente.
 - A gota espessa, realizada usualmente para o diagnóstico de malária, é também utilizada por examinadores para identificar a presença de *T. cruzi*, de forma integrada na vigilância destas doenças.
 - Havendo dúvida no exame da gota espessa, o método do esfregaço, correspondente, pode auxiliar o diagnóstico.
 - Pode ser difícil distinguir *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*, e, em caso de dúvidas, solicitar exames complementares por técnicas biomoleculares (PCR).
 - Um erro no diagnóstico pode diminuir as possibilidades de tratamento precoce, aumentando o risco de gravidade ou morte do doente.
-

Elementos figurados contaminantes na confecção da lâmina

Esfregaço sanguíneo

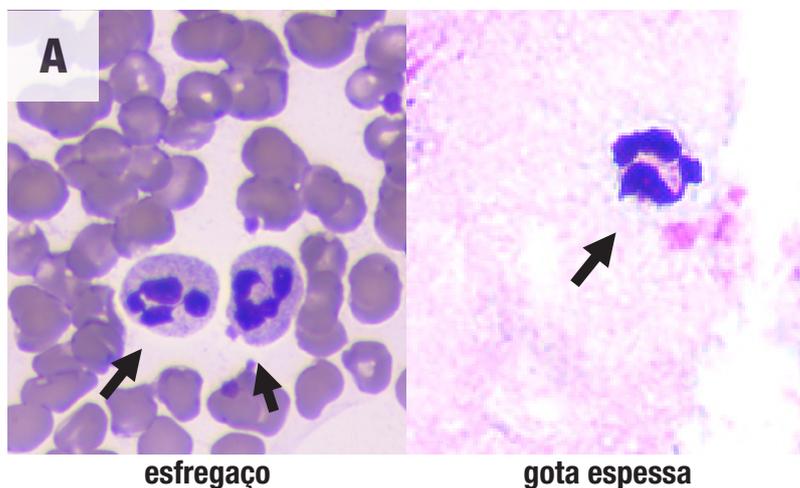
Coloração: Giemsa

Microscópio óptico: objetiva 100x

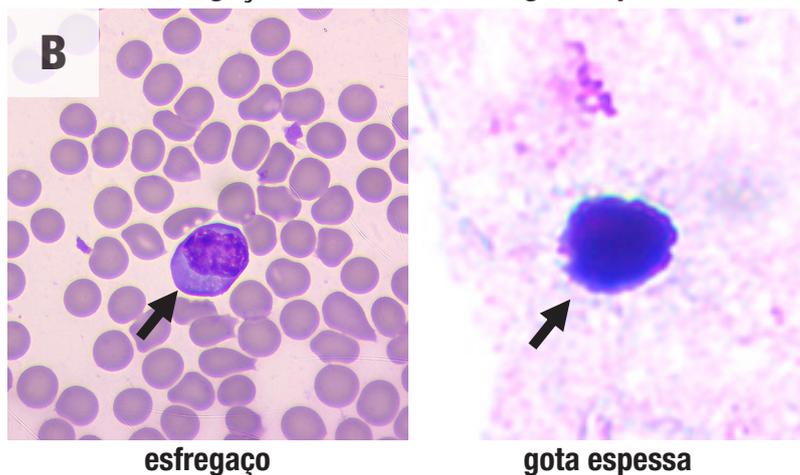


A Hemácias: Células arredondadas, anucleadas com formato bicôncavo (Setas). Apresentam coloração rósea-clara com halo central mais claro.

B e C Plaqueta e macro plaquetas: São pequenos fragmentos celulares (Setas), medem de 1 a 2 μm de diâmetro podendo ser encontrados isolados ou agrupado entre as células sanguíneas. Uma lâmina de esfregaço ideal para leitura deve ser confeccionada de forma que as hemácias (A e C) fiquem espaçadas entre si, para melhor visualização dos hemoparasitos.



A Neutrófilos: Células em que o núcleo possui cromatina densa podendo conter de dois a cinco lóbulos ligados por finas pontes de cromatina (Setas). Seu citoplasma contém grânulos finos e azurófilos.



B Linfócitos: Possuem núcleos esféricos bem condensados com alta relação núcleo/citoplasma (Setas). Neste quadro observa-se a diferença entre o esfregaço (esquerda) e gota espessa (direita) e como os elementos figurados se dispõem em cada técnica.

A doença de Chagas e sua transmissão

A doença de Chagas (DC) ou Tripanossomíase Americana é uma enfermidade infecciosa, das Américas, Central e do Sul, que se expandiu para outros continentes se tornando um problema mundial de saúde. É causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, podendo ser transmitida ao homem de várias formas:

Transmissão vetorial – ocorre pelo contato do homem, com as formas infectivas do *T. cruzi*, denominadas de tripomastigotas metacíclicas, eliminadas nas fezes e urinas de insetos triatomíneos, conhecidos como barbeiros. É a forma tradicional em áreas onde há domiciliação desses insetos hematófagos, que ao realizarem seu repasto sanguíneo no homem, ingerem grande quantidade de sangue, processo esse que dilata seu abdômen, e o obriga a eliminar as fezes e a urina, próximo ao local da picada, estimulado o ato de coçar, permitindo que o *T. cruzi* entre pela lesão da picada e alcance a corrente sanguínea.

*Obs. Se não houver eliminação das fezes no local da picada, não há possibilidades de contato e contaminação por *T. cruzi*, salvo se o inseto for esmagado.*

Transmissão oral – ocorre pelo consumo de alimentos contaminados com o *T. cruzi* como por exemplo o açaí, bacaba, patauí, caldo de cana entre outros. Atualmente no Brasil esta é a forma mais incidente e observada na Região Amazônica.

Transmissão vertical ou congênita – ocorre de mãe para o filho durante a gravidez ou no momento do parto.

Transmissão por transfusão de sangue ou transplantes de órgãos – ocorre pelo recebimento de sangue ou órgãos de doadores portadores da doença de Chagas.

Transmissão acidental – ocorre pela manipulação de material contaminado com o *T. cruzi*, principalmente em laboratórios.

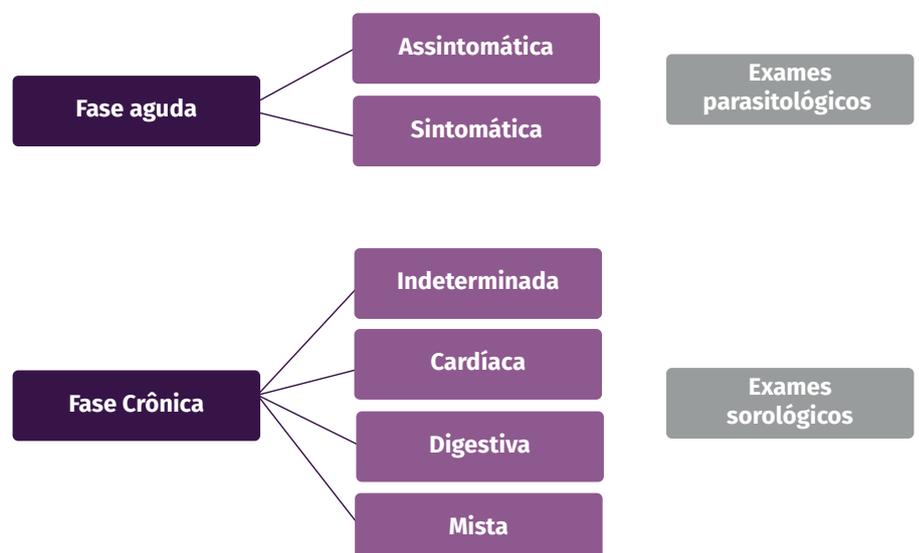
Sintomas da doença de Chagas

Após o período de incubação, cuja duração varia de acordo com as formas de transmissão, uma pessoa pode apresentar, ou não, sintomas, em diferentes momentos. Assim, em relação ao tempo, a doença de Chagas é classificada em duas fases em diferentes formas de manifestação:

1. A fase aguda da doença de Chagas–DCA: apresenta alta parasitemia, e os sinais e sintomas são transitórios. Dependendo da forma de transmissão, o quadro clínico da DCA pode variar:
 - Sinal de porta de entrada da infecção por transmissão vetorial: Sinal de Romana e Chagoma de inoculação.
 - Situações oligossintomáticas: febre, edema subcutâneo, aumento do volume de linfonodos, hepatomegalia, esplenomegalia, além de evidências de miocardite e de meningoencefalite.
 - A febre é sintoma inicial praticamente constante, em geral não ultrapassando 39,0°C; às vezes é mais elevada, especialmente em crianças.
 - O período de incubação depende da forma de transmissão. Na vetorial, este período pode ser de 4 a 15 dias, enquanto na oral, entre 3 e 22 dias.
 - A duração da fase aguda gira em torno de 2 a 4 meses.
2. Fase Crônica da Doença de Chagas – pode ocorrer em quatro situações clínicas:
 - Forma indeterminada,
 - Forma cardíaca,
 - Forma digestiva,
 - Forma mista (cardíaco e digestivo).

OBS: na fase crônica o diagnóstico é diferenciado, utilizando testes imunológicos.

Fases, formas e métodos recomendados para o diagnóstico da doença de Chagas



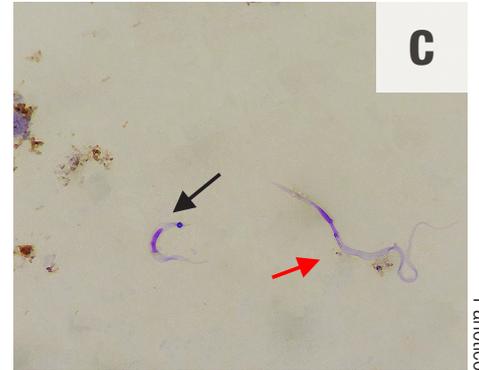
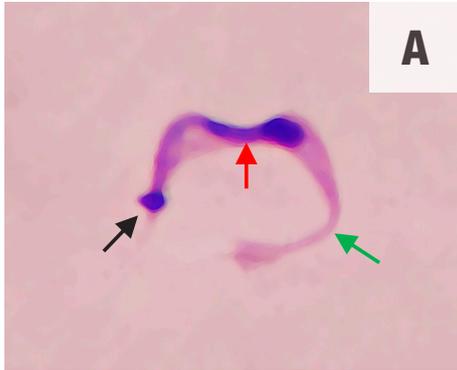
Imagens de hemoparasitos

Abaixo estão alguns hemoparasitos que podem ser encontrados durante a investigação microscópica.

Coloração: Giemsa e Panótico

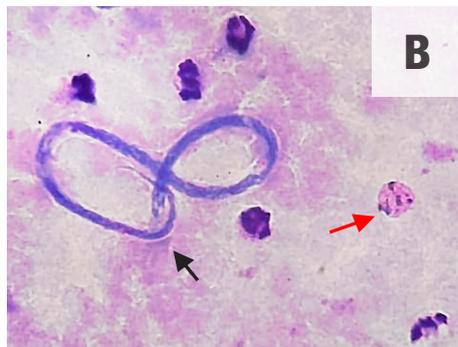
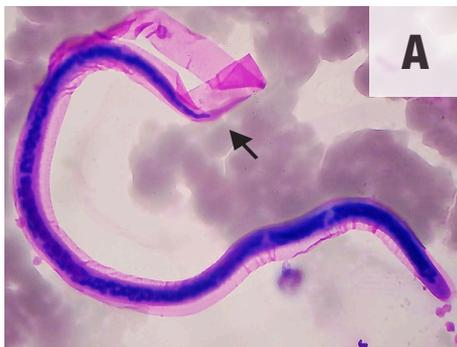
Microscópio óptico: objetiva de 100x

Trypanosoma



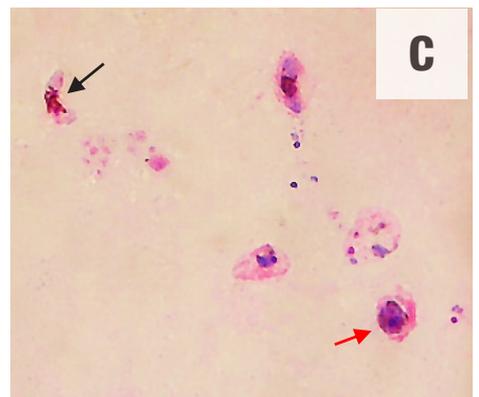
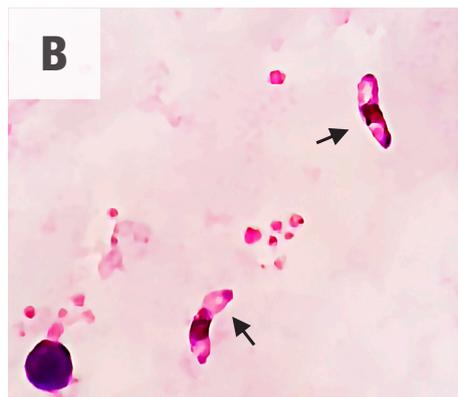
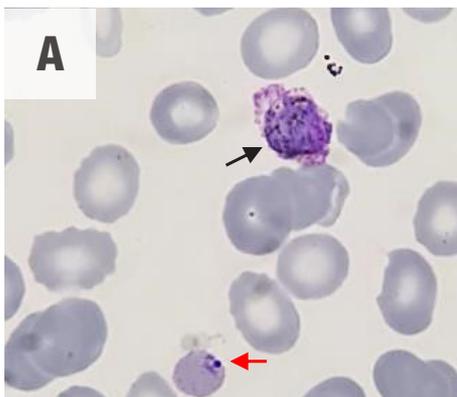
A: forma tripomastigota de *T. cruzi*. Evidencia-se, nesta imagem, o cinetoplasto (seta preta) o núcleo (seta vermelha) e o flagelo (seta verde). **B:** Forma tripomastigota de *T. rangeli*, corpo alongado com cinetoplasto (seta preta) de tamanho reduzido em relação ao *T. cruzi*. **C:** Forma tripomastigota metacíclica de *T. cruzi* e epimastigota de *T. rangeli* isoladas a partir de fezes de triatomíneo.

Filárias



As filárias podem ser encontradas em exames de microscopia de rotina em que são observados a presença dos helmintos, vermes de corpo cilíndrico alongado. Na Figura **A**, observa-se *Wuchereria bancrofti*, causadora da filariose linfática, a bainha pode ser observada nesta imagem (Seta). **B:** Coinfecção de *Mansonella* sp. (seta preta) e *Plasmodium vivax* (seta vermelha). **C:** *Mansonella* sp. (seta) e *T. cruzi* (Circulo).

Plasmodium



A: Trofozoíto jovem (seta vermelha) e gametócito (seta preta) de *P. vivax*. **B:** Gametócitos de *P. falciparum*; **C:** Infecção mista de *P. vivax* (seta vermelha) e *P. falciparum* (seta preta).

Medidas de Biossegurança necessárias ao manuseio de amostras de sangue

Os laboratórios devem seguir as diretrizes nacionais de biossegurança, baseadas em normas internacionais consagradas. Toda amostra de sangue deve ser considerada potencialmente infectante, e a equipe do laboratório deve ser treinada para adotar os procedimentos operacionais padrão e diretrizes de biossegurança, conforme a seguir:

Laboratório ou área de trabalho

- Faça a descontaminação das superfícies de trabalho com uma concentração de 0,1% de cloro disponível (1g/L) (hipoclorito de sódio), ou álcool a 70% imediatamente após um derramamento, em qualquer caso, e antes e no final do dia de trabalho.
- Manter todos os materiais em gavetas ou caixas designadas, rotuladas corretamente no exterior, em áreas livres de poeira, sujeira e insetos.

Proteção pessoal

- Todos os funcionários que lidam com amostras de sangue devem ser vacinados de acordo com a política nacional.
- Use os Equipamentos de Proteção Individual (EPI) ao manusear sangue humano, seja no laboratório ou no campo. Usar luvas para todos os procedimentos que envolvam contato eventual, direto com sangue ou material infeccioso. Descartar as luvas em locais adequados.
- Não sair do local de trabalho usando luvas de proteção.
- Usar jaleco ou bata ao trabalhar dentro do laboratório e remova-o antes de sair e quando estiver fora do laboratório.
- Proteger as lesões cutâneas, tais como cortes, abrasões, úlceras e dermatites com um curativo à prova d'água (tipo *band aid*) antes de colocar luvas.
- Não armazenar medicamentos, cosméticos ou alimentos no laboratório, e não utilizar maquiagem, evitar utilização de lentes de contato, comer ou beber em áreas de trabalho do laboratório.
- O uso do telefone celular não deve ser permitido no laboratório.
- Remover as luvas quando estiver usando um computador pessoal ou um telefone (fixo) no laboratório.
- Lavar as mãos com água corrente e use sabão antibacteriano ou álcool a 70% antes e depois do trabalho e antes de deixar o laboratório.
- Evitar tocar nos olhos, nariz ou pele com as mãos enluvadas.

Segurança durante a coleta e manuseio de sangue

- Ao manusear amostras de sangue, tenha cuidado para evitar a produção de aerossóis.
- Lavar bem com água e sabão quaisquer ferimentos perfurantes ou cortantes, bem como qualquer área da pele contaminada por sangue derramado, ou mesmo respingos.
- Notificar imediatamente ao supervisor do laboratório todos os acidentes com materiais perfuro cortantes e exposições reais ou potenciais a amostras infectantes.
- Descartar as lancetas usadas e agulhas e outros materiais contaminados em um recipiente para perfuro cortantes.

Precauções de segurança

- O metanol (álcool metílico) é inflamável e altamente tóxico se inalado ou engolido, pode causar cegueira e até morte, se engolido em qualquer quantidade.
- Evite contato e inalação.

Trypanosoma cruzi: Morfologia

Durante seu ciclo de vida o *Trypanosoma cruzi* passa por diferentes hospedeiros se modificará em **formas replicativas e infectivas**.

Formas replicativas

Amastigotas – forma arredondada ou oval, com flagelo curto não exteriorizado. Encontradas nas células teciduais de mamíferos;

Epimastigotas – forma alongada com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo; possui pequena membrana ondulante – presentes no intestino do inseto vetor

Esferomastigotas – forma arredondada, com flagelo livre, representando uma transição entre a forma amastigota e as formas flageladas – presentes no intestino do inseto vetor.

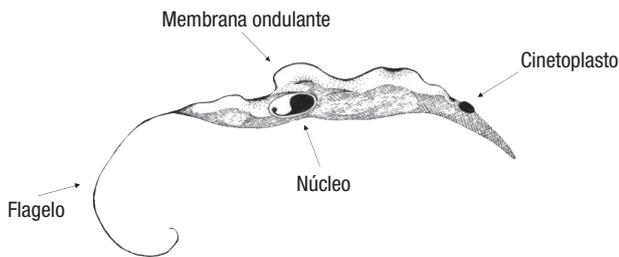
Forma Infectiva

Tripomastigotas – forma alongada com o cinetoplasto posterior ao núcleo; flagelo forma uma extensa membrana ondulante. Sua nomenclatura é definida dependendo do hospedeiro.

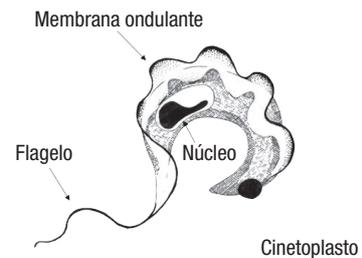
- **Tripomastigotas sanguíneas** são as formas encontradas no sangue de mamíferos (Prancha 5b)
- **Tripomastigotas metacíclicas** são as formas presentes nas fezes e urina do inseto vetor.

Desenho ilustrativo das diferenças morfológicas do *T. cruzi* e *T. rangeli*

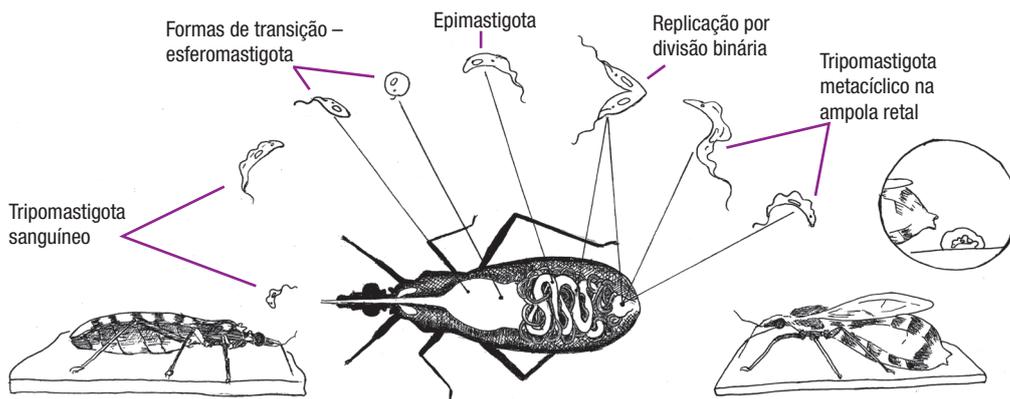
Trypanosoma rangeli



Trypanosoma cruzi



Desenho ilustrativo do ciclo de desenvolvimento do *T. cruzi*



Gota espessa 1

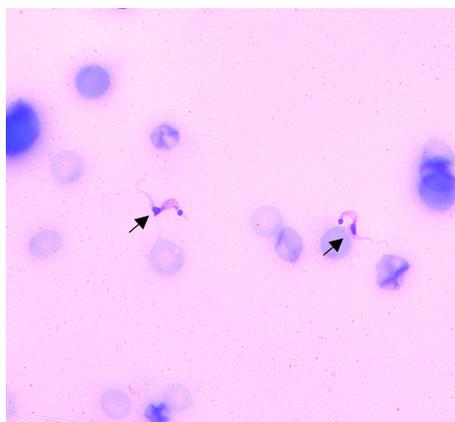
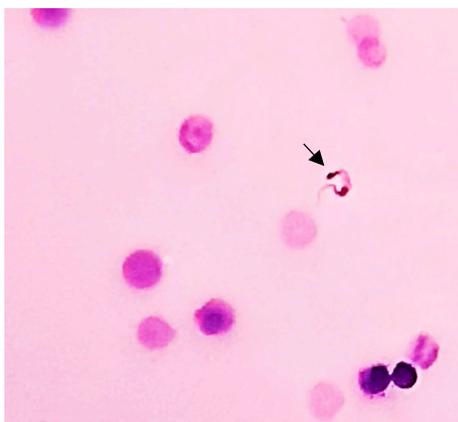
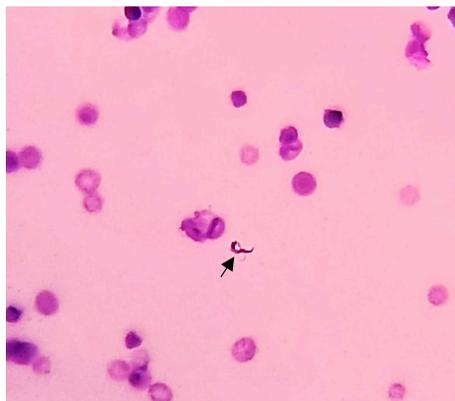
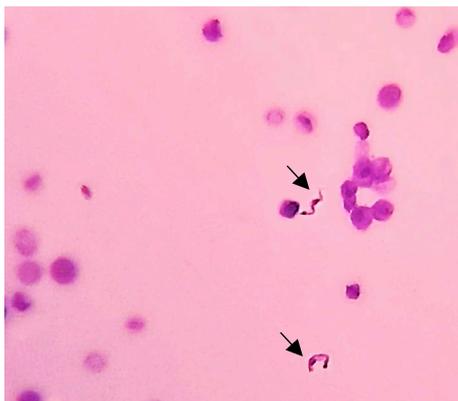
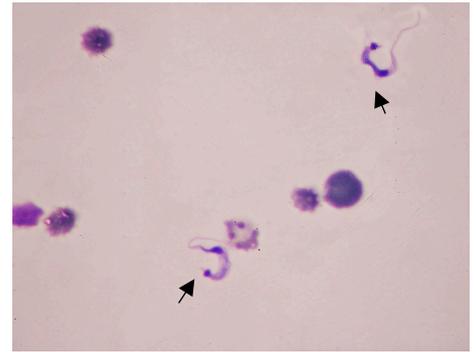
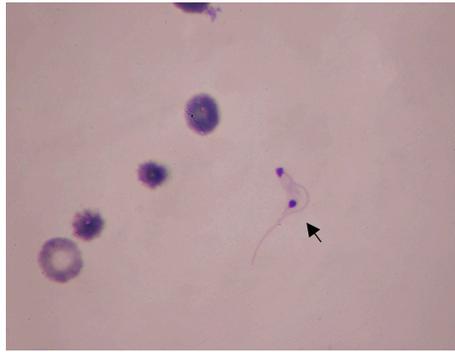
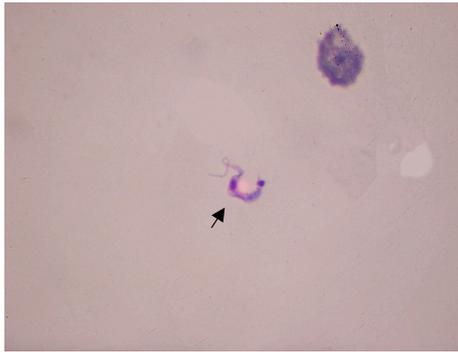
Coloração: Giemsa

Trypanosoma cruzi – Amostra de sangue de pacientes com Doença de Chagas Aguda

Microscópio óptico: objetiva 100x

Formas flageladas: tripomastigota sanguíneo

Nas imagens abaixo observa-se o *T. cruzi* no seu formato clássico de virgula ou “C”. Observe que é possível visualizar o cinetoplasto e núcleo dos parasitos, além do flagelo.



As setas destacam o parasito. Observe a relação de tamanho do parasito com leucócitos e hemácias não lisadas próximas.

Procedimentos para pesquisa direta das formas flageladas

Passo 1



Limpe a superfície do dedo com álcool 70%.

Passo 2



Com a palma da mão do paciente posicionada para cima, puncionar o dedo utilizando lanceta estéril.

Despreze a primeira gota de sangue e limpe o dedo.

Passo 3



Coletar uma gota de sangue com o auxílio de uma lâmina devidamente identificada.

Posicionar lamínula sobre a gota coletada.

Passo 4



Sob microscópio óptico, objetiva acima de 40X, observar presença de movimento de chicote e serpenteado característicos dos tripanosomatídeos.

NOTAS

A lâmina de gota espessa:

- Deve ser seca e protegida contra poeira, moscas e formigas;
- Pode autofixar se exposto a calor extremo;
- Pode ser seca suavemente com um secador de cabelo quente, entretanto para aplicação desse método é preciso: tomar cuidado para evitar a fixação de calor, que pode ocorrer rapidamente, assim, recomenda-se a realização por técnicos capacitados que demonstrem ter habilidade para execução;
- Não use esferográfica ou caneta gel para identificar as lâminas, pois a tinta se espalhará quando o sangue for fixado;
- A lâmina distensora feita corretamente deixa pouco sangue. Limpar a lâmina distensora vigorosamente com algodão embebido em álcool 70%;
- Deixar secar.

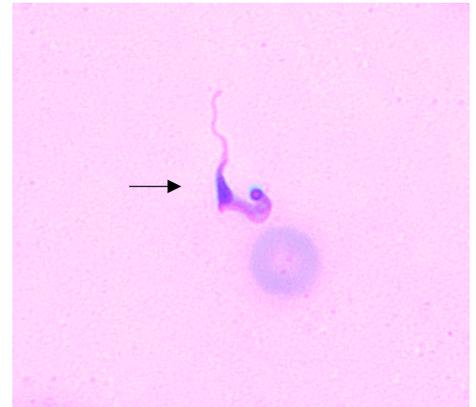
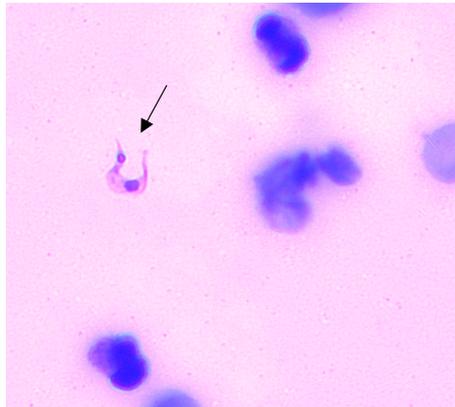
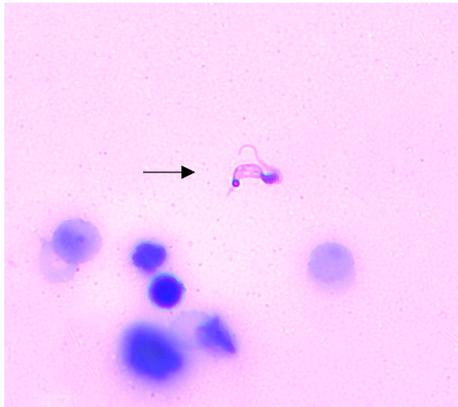
Gota espessa 2

Coloração: Giemsa

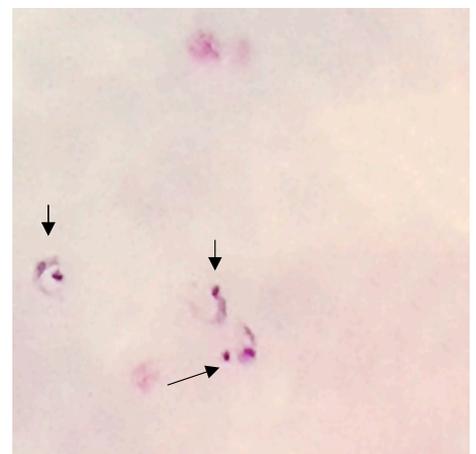
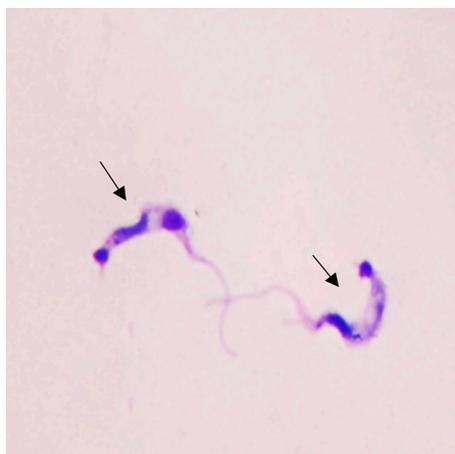
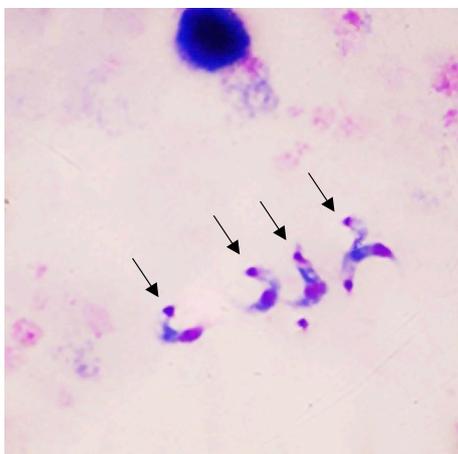
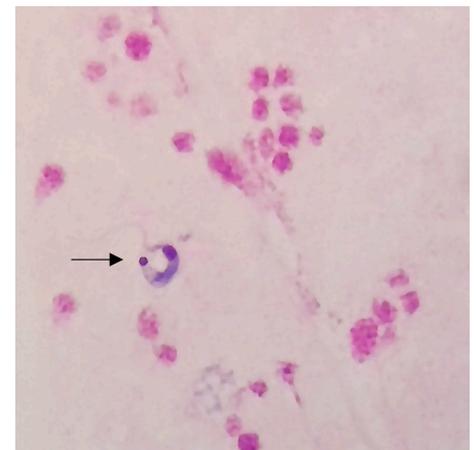
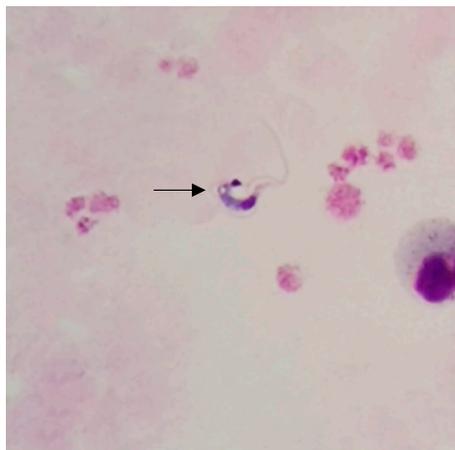
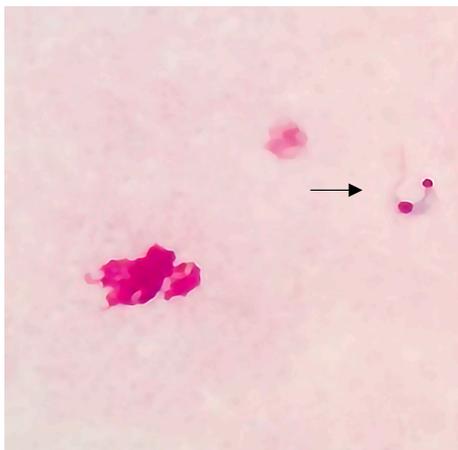
Microscópio óptico: objetiva 100x

Formas flageladas: tripomastigota sanguíneo

Observa-se, nas imagens abaixo, diferentes lâminas de gota espessa positivas para *T. cruzi*. As diferentes colorações se dão pela confecção das lâminas e intensidade de iluminação do microscópio.



Em alguns casos, não será possível verificar certas características do parasito como membrana ondulante, flagelo etc. É importante estar atento nos demais caracteres morfológicos como núcleo e cinetoplasto.



Trypanosoma cruzi – Amostra de sangue de pacientes com Doença de Chagas Aguda.

Confeção de gota espessa

Gota espessa microscopia de rotina

Passo 1



Limpe a superfície do dedo com álcool 70%.
Utilizando uma lanceta estéril, puncione o dedo anelar.
Despreze a primeira gota de sangue e limpe o dedo.

Passo 2



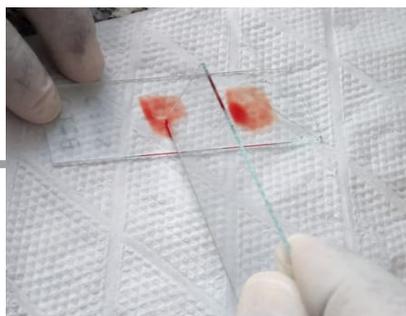
Com o auxílio de uma lâmina devidamente identificada com informações do paciente, colete duas gotas de sangue.

Passo 3



As gotas de sangue devem estar distantes e com quantidade suficiente para completar a confecção da gota espessa.

Passo 4



Com o auxílio de uma lâmina "distensora", fazer retângulos, espalhando o sangue por uma área de aproximadamente 1cm.

Nota: Uma gota espessa adequada deve ter de 1 cm² a 1,5 cm² de superfície, o que aproximadamente equivale a 500 a 800 campos microscópicos, quando se trabalha com aumento de 700 a 800 vezes. É encontrada uma média de 10 a 20 leucócitos por campo.

Confecção de gota espessa e esfregota na mesma lâmina

Passo 1



Limpe a superfície do dedo com álcool 70%.

Passo 2



Com uma lanceta, puncione a lateral do dedo.

Despreze a primeira gota de sangue e limpe o dedo.

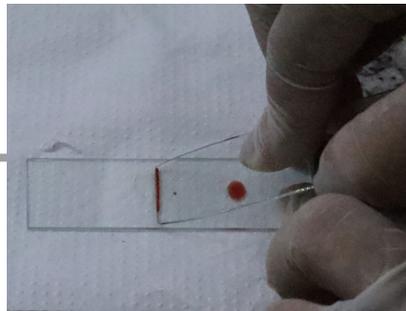
Passo 3



Colete duas gotas de sangue.

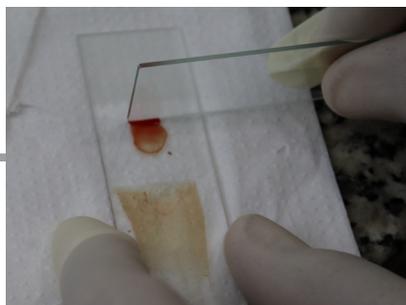
Em seguida limpe o local com álcool.

Passo 4



Usando uma lâmina “distensora”, faça um esfregaço empurrando a gota de sangue para frente em um movimento contínuo.

Passo 5



Usando uma lâmina “distensora”, faça a gota espessa moldando a gota de sangue em um retângulo.

Passo 6



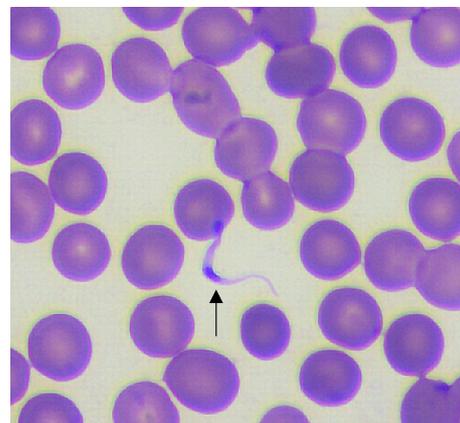
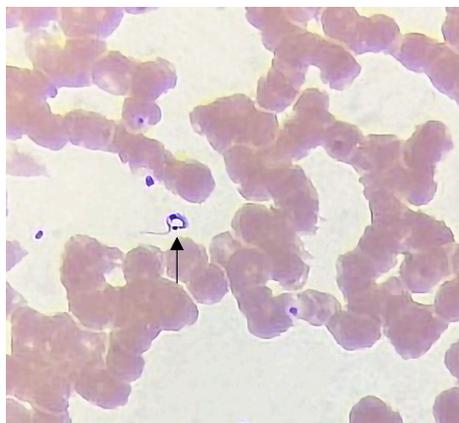
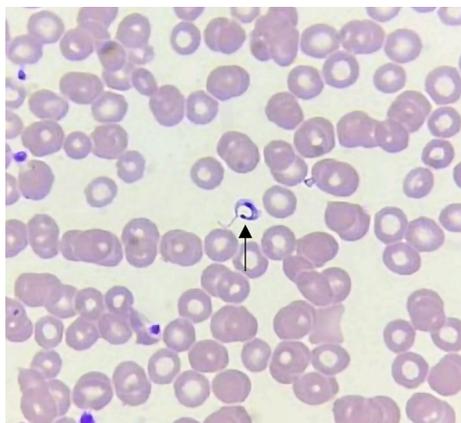
O método de coloração a ser empregado pode ser observado na **Prancha 8A**.

Esfregaço *T. cruzi* – Pacientes com DCA

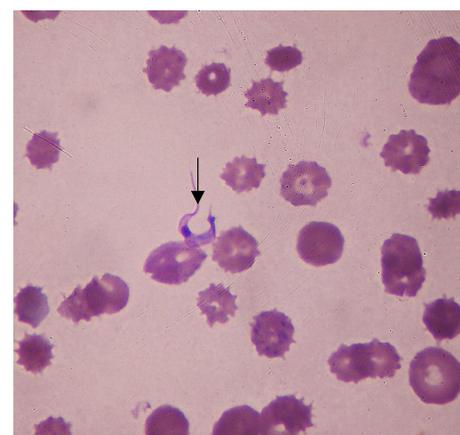
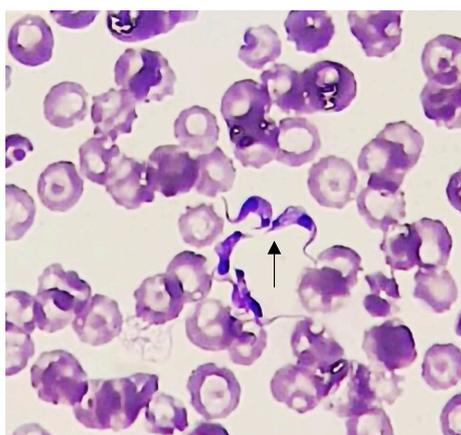
Coloração Giemsa

Microscópio óptico: objetiva 100x

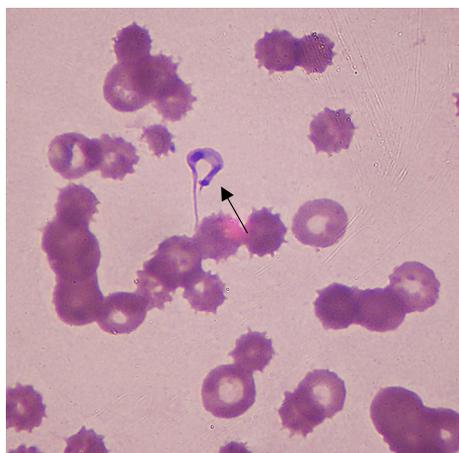
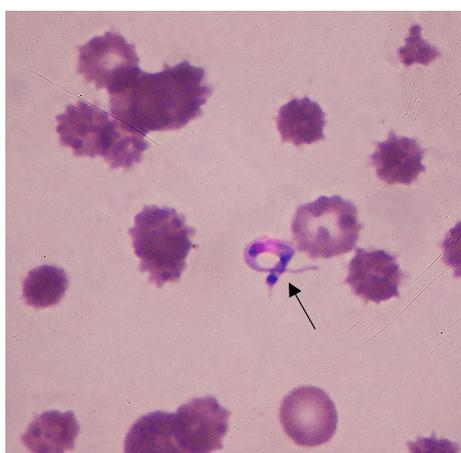
Quando não há possibilidade de confeccionar lâmina por gota espessa, o esfregaço pode ser utilizado como técnica para confecção. É preciso, porém, ficar atento a qualidade, pois no esfregaço, a presença de hemácias em grande quantidade pode prejudicar o diagnóstico.



Observe que nas imagens acima, as hemácias adensadas podem dificultar a visualização do parasito, podendo confundir o microscopista.



O esfregaço deve ser executado de tal forma que as hemácias fiquem espaçadas, para facilitar a investigação dos parasitos



Esfregaço contendo formas de tripomastigota sanguíneo de *T. cruzi*. É possível observar o formato de virgula característico do parasito (Setas).

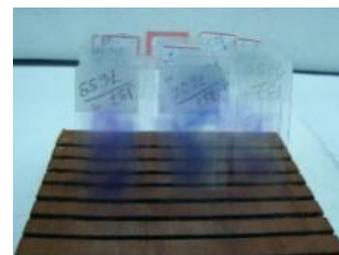
Método de Walker - Gota espessa Tradicional

1ª fase: Desemoglobinação pela solução hipotônica de azul de metileno

- Aplicar a solução de azul de metileno sobre a gota espessa, por 2 segundos.
- Lavar a lâmina com água tamponada.
- Lado oposto da lâmina.

2ª fase: Coloração pela solução de Giemsa

- Preparar o corante de Giemsa na proporção de: **01 gota de Giemsa para 1 ml de água tamponada.**
- Aplicar a solução na placa recurvada.
- Colocar as lâminas com a gota voltada para baixo.
- Ajuste o relógio para **7-10 minutos para a coloração.**
- Lavar suavemente todo o corante da lâmina deixando cair água tamponada sobre ela.
- Deixe as lâminas secarem ao ar calor suave ou sob ventilação.



Método de Walker - Gota espessa Modificado

- Preparar o corante na proporção de: **02 gotas de Giemsa e 01 gota da solução de Azul de Metileno para 1 ml de água tamponada.**
- Igual a 2ª Fase do Método Tradicional.

Método de Giemsa - Gota espessa Alternativa na ausência da Solução de Azul de Metileno

- Preparar o corante na proporção de: **01 gota de Giemsa para 1 ml de água tamponada.**
- Ajuste o relógio para **20-30 minutos para a coloração.**
- Os demais passos são iguais a 2ª Fase do Método Tradicional.

Método de Giemsa - Esfregaço

- Fixar o esfregaço com álcool metílico (pode ser o do Corante Panótico)
- Preparar o corante na proporção de: **01 gota de Giemsa para 1 ml de água tamponada**
- Ajuste o relógio para **15-20 minutos para a coloração**
- Os demais passos são iguais a 2ª Fase do Método Tradicional

Método de Giemsa - Esfregota

- Fixar apenas o esfregaço com álcool.
- Evite o contato com a gota espessa para impedir a fixação acidental
- Preparar o corante na proporção de: **01 gota de Giemsa para 1 ml de água tamponada**
- Ajuste o relógio para **15-20 minutos para a coloração**
- Os demais passos são iguais a 2ª Fase do Método Tradicional

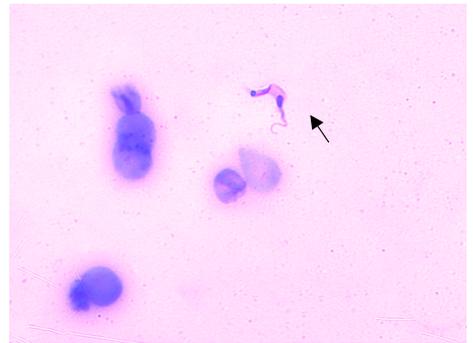
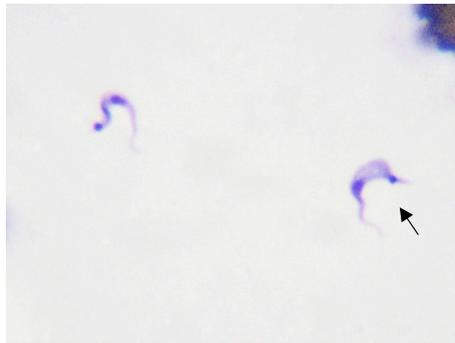
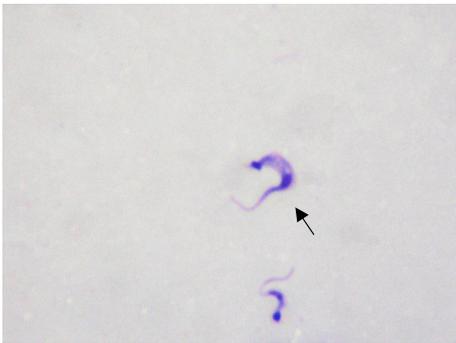
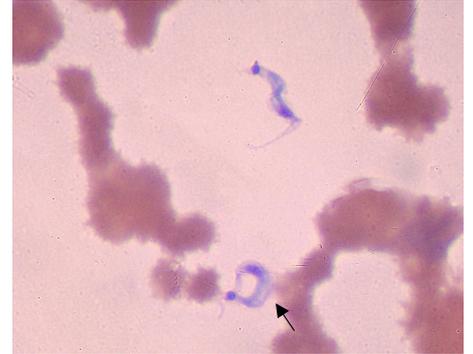
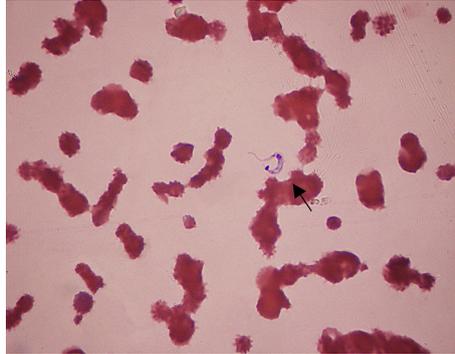
Gota espessa 3

Coloração: Giemsa

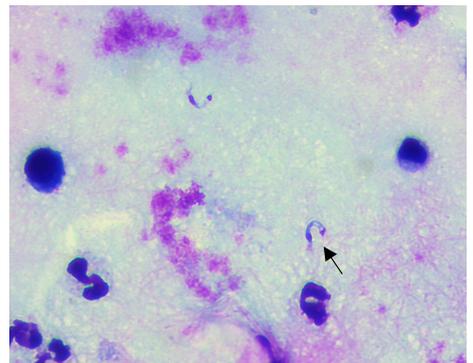
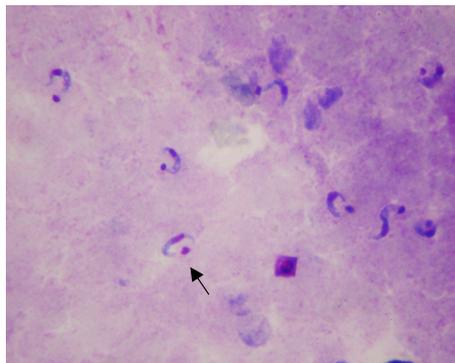
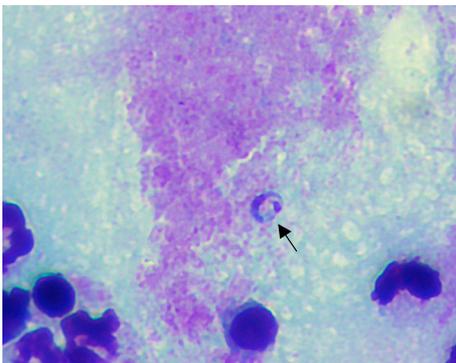
Trypanosoma cruzi – Amostra de sangue de pacientes com Doença de Chagas Aguda

Microscópio óptico: objetiva 100x

Formas flageladas: tripomastigota sanguíneo



Abaixo estão imagens de *T. cruzi* provenientes de amostras de pacientes com DCA. Observe que as formas dos parasitos podem se assemelhar a Trofozoítos jovens de *Plasmodium* sp.



Erros comuns na confecção do esfregaço sanguíneo

Vários erros são comuns na confecção e preparo de lâminas de sangue (gota espessa e esfregaço) e podem afetar negativamente a rotulagem, a coloração e o exame.

▶ **Esfregaço grande demais e orientado na direção errada**

▶ **Esfregaços mal posicionados na lâmina podem raspar nas bordas da cuba de coloração e no suporte de secagem e dificultam o alinhamento da lente objetiva do microscópio para exame.**

▶ **Gota espessa no lugar errado**

▶ **Muito sangue**

Após a coloração, o campo da gota espessa ficará fortemente corado devido ao excesso de leucócitos, o que obscurecerá os parasitos; as muitas camadas de hemácias fixadas tornarão impossível o exame do esfregaço.

▶ **Pouco sangue**

O exame padrão não será possível, e o esfregaço será pequeno demais para usar como rótulo.

▶ **Lâmina engordurada**

Partes da gota espessa se desprenderão durante a coloração; a lâmina ficará irregular, dificultando o exame e tornando o resultado não confiável.

▶ **Lâmina distensora com borda lascada**

O esfregaço delgado terá muitas “caudas”, e a gota espessa pode ficar irregular.

▶ **Outros problemas comuns**

Outros problemas comuns que ocorrem com frequência no preparo de lâminas de sangue incluem:

- Consumo do sangue seco como alimento por moscas, baratas ou formigas, o que danifica o esfregaço;
- Uso de lâminas muito arranhadas ou lâminas com a superfície “jateada” ou brilhante;
- Secagem desigual da gota espessa;
- Ocorrência de auto fixação da gota espessa com o passar do tempo ou por exposição ao calor, que dificulta ou afeta a qualidade da coloração;
- Embrulhar as lâminas juntas antes que todas as gotas espessas estejam devidamente secas, fazendo com que as lâminas grudem umas nas outras.

Materiais e equipamentos necessários

Insumos, materiais e equipamentos

No diagnóstico da doença de Chagas, faz-se necessário estruturação de um laboratório com disponibilidade de insumos e equipamentos básicos, fundamentais para a coleta de material, coloração das lâminas e visualização do *T. cruzi*. Entre os materiais estão:

1. Lâminas para microscopia;
2. Etiqueta adesiva;
3. Luvas de látex de proteção descartáveis;
4. Álcool 70%;
5. Lanceta de segurança;
6. Algodão;
7. Caixa descartex;
8. Frasco conta gotas com corante de Giemsa;
9. Pissete com solução de Azul de Metileno fosfatado;
10. Proveta de 50 ml;
11. Pissete com água tamponada;
12. Relógio marcador de tempo;
13. Bandeja/taco para secagem de lâminas;
14. Óleo de imersão;
15. Microscópio óptico;
16. Álcool metílico absoluto, sem acetona;
17. Lâmina extensora;
18. Lamínulas.

Referência Bibliográfica

Chagas C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;1:159–218.

Coura JR, Junqueira ACV, Gonçalves TCM, Carvalho Moreira CJ. Manual de capacitação na detecção de *Trypanosoma cruzi* para microscopistas de malária e laboratoristas de rede de saúde pública, OPAS/OMS-Fiocruz, Rio de Janeiro, 2011.284 pp.

Brener Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In Dias JCP, Coura, JR (eds), Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Um Manual Prático para o clínico geral. Fiocruz, Rio de Janeiro, 1997. p25-31.

Dias CP et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Epidemiologia e Serviços de Saúde. 2016. p. 1–10.

Monteiro WM, Barbosa MGV, Guerra JAO, Melo GC, Barbosa LRA, Machado KVA, Abreu Netto RL, Lacerda MVG. Driving forces for strengthening the surveillance of Chagas disease in the Brazilian Amazon by “training the eyes” of malaria microscopists. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2020;53:e20190423

Organização Pan-Americana da Saúde. Bases do Diagnóstico Microscópico da Malária. Parte 1: Guia do Aluno. Brasília, D.F.2020.

Organização Pan-Americana da Saúde. Bases do Diagnóstico Microscópico da Malária. Parte 2: Guia do Instrutor. Brasília, D.F.2020.

Zeledón R, Alvarado R, Jirón LF 1977. Observations on the feeding and defecation patterns of three triatomine species (Hemiptera: Reduviidae). Acta Trop 34: 65-77.

Elaboração

Maria das Graças Vale Barbosa Guerra – Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado-FMTHVD /Universidade do Estado do Amazonas-UEA

Ana Ruth Lima Arcanjo – LACEN/Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas

Sheila Rodrigues Rodvalho – Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS – Brasil)

Colaboração produção de imagens

Rubens Celso Andrade da Silva Junior – Mestre PPGMT – FMTHVD

Denison Vital de Jesus – Mestrando PPGMT – UEA/FMTHVD

Matheus Martins Monteiro – Mestrando PPGMT – UEA/FMTHVD

Rômulo Freire de Moraes – Secretaria de Saúde do Estado do Amazonas

Walter Cruz Bardall – LACEN/Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas

Ricardo Mauro da Silva – LACEN/Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas

Revisão

Fernanda Alvarenga Cardoso Medeiros – Fundação Ezequiel Dias – Funed/MG

Mayara Maia Lima – CGZV/DEIDT/SVS/MS

Swamy Palmeira – CGZV/DEIDT/SVS/MS

Veruska Maia da Costa – CGVZ/DEIDT/SVS/MS

Job Alves de Souza Filho – Fundação Ezequiel Dias – Funed/MG

Imagens

Laboratório Central (LACEN) – Fundação de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas

Gerência de Entomologia – Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado

