

**VALIDAÇÃO DE TÉCNICAS DE COLORAÇÃO UTILIZADAS EM  
PARASITOLOGIA.**

Validation of the staining techniques used in parasitology.

DANIEL QUIRINO SOARES<sup>1</sup>

JOANNE ANTÃO DA SILVA<sup>1</sup>

SAMYRES IARA DOS SANTOS<sup>1</sup>

RISONILDO PEREIRA<sup>2</sup>

AYLA GOMES<sup>2</sup>

- 1- Discentes do curso de Bacharelado em Biomedicina da Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES), Caruaru (PE), Brasil.
- 2- Docentes da Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES), Caruaru (PE), Brasil.

## Resumo

**Introdução:** A coloração das lâminas na parasitologia é o principal método de diagnóstico e o corante mais usado é o lugol sendo tido como padrão ouro nesse tipo de técnica.

**Objetivo:** Comparar as colorações de Hematoxilina Férrica e Ziehl-Neelsen e verificar a sensibilidade e a especificidade dessas colorações em relação ao lugol.

**Materiais e Métodos:** Foi realizada a análise de 218 amostras de fezes provenientes dos pacientes atendidos no Projeto Prevenção e detecção de doenças infecto-contagiosas parasitárias da Faculdade ASCES, Caruaru-PE. Essas amostras foram submetidas as técnicas de coloração para poder ser feita a análise, das amostras analisadas. **Resultados:** Destas, 19% (42/218) foram positivas na coloração de Lugol. Ao verificar as outras colorações, foram observadas uma maior positividade nas técnicas de coloração permanente, sendo que 31,2% (68/218) foram positivas na coloração de Hematoxilina férrica e 34% (76/218) positivas na coloração de Ziehl-Neelsen. Demonstrando assim, um aumento de positividade em torno de 64,2 % pela hematoxilina férrica e 78,9% pela coloração de Ziehl-Neelsen. Com a sensibilidade de 100% em ambas as técnicas. **Conclusão:** Com isso conclui-se que as colorações apresentaram resultados satisfatórios quanto a identificação de protozoários pela sua alta sensibilidade (100%) ambas as técnicas podem ser utilizados como métodos de triagem.

**Palavras chave:** Coloração, Sensibilidade, Especificidade, Hematoxilina.

## **Abstract**

**Introduction:** The coloring of blades in parasitology is the main method of diagnosis and the most widely used dye is being regarded as lugol's gold standard in this kind of technique. **Objective:** to Compare the colors of Chlorosis and Ziehl-Neelsen Hematoxylin and verify the sensitivity and specificity of these colourings in relation to lugol's iodine. **Materials and methods:** analysis of 218 stool samples from the patients in the project prevention and detection of infectious diseases and parasitic diseases of ASCES College, Caruaru-PE. These samples were subjected to coloration techniques could be made, analysis of samples analysed. **Results:** of these, 19% (42/218) were positive in Lugol's iodine staining. To check the other colorings, observed greater positivity in permanent staining techniques, with 31.2% (68/218) were positive in iron Hematoxylin staining and 34% (76/218) positive Ziehl-Neelsen staining. Thus demonstrating an increase of positivity around 64.2% by iron hematoxylin and 78.9% by Ziehl-Neelsen staining. With 100% sensitivity in both techniques. **Conclusion:** it is concluded that the colors presented satisfactory results as the identification of protozoa by its high sensitivity (100%) both techniques can be used as screening methods.

**Keywords:** Staining and Labeling, Specificity, Sensitivity, Hematoxylin.

## Introdução:

Existe em torno de 729 espécies de protozoários distribuídos na natureza. Todavia, apenas 282 são patogênicos ao homem. Destes, alguns possuem maior interesse clínico por estarem associados geralmente a hábitos inadequados de higienização, ou por se tratar de algum protozoário com grande potencial zoonótico<sup>1,2</sup>. Dentre as inúmeras espécies patogênicas, existentes algumas se destacam, como: *Giardialamblia*, *Sarcocystissp*, *Balantidium sp.*, *Entamoebahitolyticae* *Isospora belli*, que habitam o intestino do homem, causando diversas sintomatologias compatíveis com verminoses. Os sintomas mais comuns são a diarreia ou disenteria<sup>3</sup>. Esses parasitas devem ser diagnosticados e tratados, pois a persistência deles no organismo humano podem levar a quadros graves de anemia, desidratação e desnutrição<sup>3</sup>.

O padrão ouro, no que diz respeito ao diagnóstico laboratorial dessas parasitoses intestinais é a visualização, por microscopia ótica dos cistos dos protozoários em lâminas de vidro contendo o sedimento fecal<sup>3</sup>. Dessa forma, o sedimento necessita ser corado para aumentar a sensibilidade da técnica e assim garantir a visualização de todas as estruturas do cisto, proporcionando um bom diagnóstico ao paciente. Geralmente, na prática laboratorial, o corante utilizado é lugol, porém a utilização de outros corantes, como a coloração de Zilehl-neelsen e Hematoxilina férrica estão sendo aplicadas, embora ainda de forma muito comedida<sup>4</sup>.

A coloração é de grande importância para o diagnóstico, pois eles agem diretamente na membrana citoplasmática e em outras estruturas dos protozoários, possibilitando uma melhor visualização da forma evolutiva<sup>5</sup>. Essa visualização caracteriza-se pelo tamanho, forma e nitidez das estruturas de cada protozoário.

Garcia, Simões e Alvarenga (2007) ao analisarem diferentes métodos de processamento e de colorações frente ao diagnóstico de *Giardialamblia*, observaram que a técnica correta de processamento (Faust e cols) associado à coloração permanente (hematoxilina Férrica), foram as melhores ferramentas para o diagnóstico desse parasita<sup>6</sup>. Já Eymael e Cols (2010) também observaram uma melhora no desempenho do diagnóstico no emprego de colorações permanentes no diagnóstico do *Blastocystis hominis*<sup>7</sup>.

Diante do exposto, esse estudo pretende verificar a sensibilidade e especificidade dos corantes Zilehl-neelsen e Hematoxilina férrica, comparando-os com o lugol. Isso será

de importância para a pesquisa de protozoários, tendo em vista que há uma escassez de trabalhos relacionados ao tema.

### **Casuística e Métodos:**

Trata-se de um estudo documental, quantitativo, comparativo e analítico. Foram avaliadas amostras fecais provenientes dos pacientes atendidos pelo Projeto Prevenção e detecção de doenças infecto-contagiosas parasitárias da Faculdade ASCES, Caruaru-PE, no período de fevereiro e março de 2016. Sendo assim, foi considerado para o cálculo da amostra, o universo de 500 amostras que foi considerado com base na média de coletas durante o período do estudo em anos anteriores.

Para tal, foi utilizado como parâmetro o erro amostral de 5%, foi considerado um intervalo de confiança de 95% e prevalência de 50%, sendo necessário uma amostra de 218 indivíduos, sendo 109 positivos para cisto/trofozoito e 109 negativo para cisto/trofozoito. Foram incluídas no estudo todas as amostras com resultado “positivo” e “negativo” para a presença de protozoários dos pacientes atendidos pelo Projeto de Parasitologia. Foram também excluídas as amostras com ovos de helmintos em nossa pesquisa. Assim, os dados de cada lâmina avaliada (positivo e negativo), em relação a cada corante utilizado foram armazenados e avaliados no EPI INFO 6.04d. Foram confeccionadas as tabelas 1 e 2 para os cálculos da validade das técnicas de diagnóstico. Os cálculos foram realizados de acordo com as fórmulas abaixo:

- Sensibilidade:  $a/(a+c)$
- Especificidade:  $d/(b+d)$
- Valor preditivo positivo:  $a/(a+b)$
- Valor preditivo negativo:  $d/(c+d)$

### **Resultados:**

Das 218 amostras analisadas, foi observado uma positividade em 19% (42/218) das que utilizaram a coloração de Lugol, o padrão de referência considerado no estudo. Ao verificar as outras colorações em testes (Hematoxilina férrica e Ziehl-Neelsen), observou-se uma maior positividade nestas técnicas de coloração permanente, sendo que 31,2% (68/218) foram positivas na coloração de Hematoxilina férrica e 34% (76/218), positivas na

coloração de Ziehl-Neelsen. Demonstrando assim, um aumento de positividade em relação a coloração de lugol, em torno de 64,2% pela Hematoxilina férrica e 78,9% pela coloração de Ziehl-Neelsen, respectivamente.

Ao analisar o desempenho para diagnóstico de protozoários, a técnica de coloração de hematoxilina férrica mostrou uma excelente sensibilidade (100%) e valor preditivo negativo (100%) em relação à técnica de lugol, demonstrando uma superioridade quanto a técnica de referência ou padrão ouro, a coloração de lugol. Já na verificação de resultados negativos, esta técnica demonstrou-se com um menor desempenho, apresentando uma especificidade de valor preditivo positivo, apresentando 85% e 61% respectivamente (Tabela 1).

Quanto a coloração de Ziehl-Neelsen, também mostrou uma excelente sensibilidade (100%) e valor preditivo negativo de (100%) em relação a técnica de referência, demonstrando uma superioridade. Já na verificação de resultados negativos, esta técnica demonstrou um menor desempenho, apresentando especificidade e valor preditivo positivo, apresentando 81% e 56%, respectivamente (Tabela 2).

### **Discussão:**

As técnicas de coloração comparadas no estudo, mostraram bom desempenho na identificação de vários protozoários, e podem assim ser uma boa opção. Apesar do lugol ser o corante mais utilizado no diagnóstico parasitológico, nos últimos anos têm sido introduzidas novas colorações na rotina laboratorial, estas são importantes, pois facilitam o diagnóstico de alguns parasitas, tendo em vista a sua estrutura, destacamos dentre elas as =colorações de Ziehl-Neelsen e Hematoxilina férrica.

Após a análise, foi verificado que as colorações apresentaram resultados satisfatórios quanto a identificação de protozoários, sendo que alguns deles foram mais facilmente visualizados na coloração de Ziehl-Neelsen, este corante apresentou uma melhor sensibilidade na identificação da *Isospora belli*, da mesma forma foi visto no trabalho de Rodrigues (2016), onde foi identificado vários oocistos de *Isospora belli* com esta mesma coloração <sup>9,10</sup>.

Já a hematoxilina férrica mostrou mais eficácia na visualização das *Entamoebas sp*, já que destaca bem os detalhes de núcleos e cromatinas delas. Os aspectos morfológicos

comumente mais observados por esse corante são: Cariossoma, cromatina, núcleo, grânulos e membrana nuclear<sup>8</sup>. Resultado semelhante foi visto no trabalho de Nascimento (2005) onde utilizando este mesmo corante conseguiu identificar melhor as *entamoebas sp* devido a sua quantidade de núcleos<sup>12</sup>.

A hematoxilina é um corante natural, extraído de *Hematoxylon campechianum*, da família *Leguminosae*. Antes do uso deve amadurecer e reagir com o sulfato férrico-amônio transformando-se na hematoxilina férrica, que tem sido tradicionalmente recomendada para a coloração de protozoários intestinais. O processo pode ser simplificado sem perda de qualidade dos resultados, tornando-se aplicável à rotina<sup>11</sup>.

Há importância do diagnóstico correto, pois existem relatos que consideram a possibilidade dos protozoários e isosporozoários como *Blastocystishominis e Isosporabeli* causarem manifestações clínicas, sobretudo quando excluídos outros agentes tidos como patogênicos. Outrossim, julgam que a quantidade encontrada influencia, em especial, nos indivíduos imunocomprometidos<sup>13,14</sup>. Alguns autores sugerem que esses devam ser considerado patogênico somente em pessoas sintomáticas, especialmente crianças, ou quando o número de organismos no exame microscópico das fezes excederem cinco organismos por campo<sup>15</sup>. Na coloração de Lugol, esses parasitas podem ser confundidos com outros ou mesmo não identificados em função da sua forma ou tamanho<sup>16,13</sup>.

Semelhante ao relatado por Amato Neto e cols (2004), a identificação dos oocistos tornou-se extremamente facilitada com a utilização de técnicas de coloração permanente, muito embora principalmente pela coloração por hematoxilina férrica. Como vantagens da utilização de qualquer uma das técnicas de coloração permanente, pode-se citar a sua utilização rotineira nos laboratórios clínicos, seja no setor de Hematologia ou no setor de Bacteriologia, o que dispensa o gasto econômico do laboratório com a montagem de uma técnica de coloração específica<sup>17</sup>.

Embora o método de coloração seja um processo mais demorado e trabalhoso que os métodos convencionais utilizados, muitas publicações relatam que este é o método mais sensível para a visualização de protozoários e isosporozoários, o que evidencia a necessidade de se incluir a coloração na rotina do laboratório, evitando assim a ocorrência de resultados falso-negativos<sup>13,17,18,19</sup>.

**Conclusão:**

Podemos, portanto, concluir que as colorações de hematoxilina férrica e Ziehl-Neelsen, mostraram ter uma sensibilidade maior para a visualização dos protozoários intestinais, principalmente os *oocistos*, contudo é necessário fazer mais estudos com um quantitativo maior de amostras para uma para a obtenção de resultados precisos.

## Referências:

- 1- Girotto KG. *et al.* Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infection in elderly residents at long-term residency institutions in southeastern Brazil. São Paulo, Rev Inst Med Trop 2013; 55(1):19-24.
- 2- Thompson RCA. Giardíase como uma doença infecciosa re-emergentes e seu potencial zoonótico. 5 ed. São Paulo, Ulbra; 2000
- 3- Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. Parasitologia Humana. 12 ed. São Paulo, Atheneu; 2011.
- 4- De Carli GA. Parasitologia Clínica: Diagnóstico de Laboratório dos Coccídios e Microsporídios Intestinais. 2 ed. Porto Alegre, Cadernos Edipucrs; 2000.
- 5- Carvalho CCAR. Manual de parasitologia humana. 2 ed. Canoas, Ulbra; 2005
- 6- Garcia JGD, Simões MJS, Alvarenga VLS. Avaliação de diferentes métodos no diagnóstico laboratorial de *Giardia lamblia*. Rev. Ciênc. Farm Básica 2006; 27(3):253-258
- 7- Eymael D, Schuh GM, Tavares RG. Padronização do diagnóstico de *Blastocystis hominis* por diferentes técnicas de coloração Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2010 43(3):309-312, mai-jun
- 8- Mazzucco AM, De Souza WJS, Schuster FS, Coutinho SG. O "complexo histolytica" e outros protozoários intestinais em um grupo de crianças no rio de janeiro. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1976; 10(5): 285-296
- 9- Rodrigues RD, Gomes LR, de Souza RR, Barbosa FC. Comparação da eficiência das colorações de Ziehl-Neelsen modificado e safranina modificada na detecção de oocistos de *Cryptosporidium spp.* (Eucoccidiorida, Cryptosporidiidae) a partir de amostras fecais de bezerros de 0 a 3 meses. Goiânia, Cienc. anim. Bras. 2016, 17(1):119-125 jan/mar.
- 10- Lobo LQ. Principales aspectos de los coccidios asociados a diarrea en pacientes VIH positivos. Acta méd. Costarric 2012; 54 (3):139-145, jul-set.
- 11- Ferreira CS. Staining of intestinal protozoa with Heidenhain's iron-haematoxylin. Rev. Inst. Med. trop. 2003; S. Paulo, 45(1):43-44, Jan-Fev.

- 12- Nascimento SA, Moitinho MLB. Blastocystishominis and other intestinal parasites in a community of Pitanga city, Paraná state, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 2005; 47(4):213-217, Jul-Ago.
- 13- Alarcón RSR, Amato Neto V, Gakiya E, Bezerra RC. Observações sobre *Blastocystishominis* e *Cyclosporacayetanensis* em exames parasitológicos efetuados rotineiramente. *RevSocMedTrop* 2007; 40:253-255.
- 14- Amato Neto V, Alarcón RSR, Gakiya E, Ferreira SC, Bezerra RC, Santos AG. Elevada porcentagem de blastocistose em escolares de São Paulo – SP. *RevSocBrasMedTrop* 2004; 37:354-356.
- 15- Nimri LS. Evidence of an epidemic of *Blastocystishominis* infections in preschool children in Northern Jordan. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2706-2708
- 16- Waldman E, Tzipori S, Forsyth JRL. Separation of *Cryptosporidium* species oocysts from feces by using a Percoll discontinuous density gradient. *J Clin Microbiol* 1986; 23:199-200
- 17- De Carli GA. Diagnóstico laboratorial das parasitoses humanas. Rio de Janeiro: Medsi; 1994.
- 18- Barassa B, Bueno VS. Estudo comparativo entre os métodos de centrífugo-flutuação e de centrífugo-sedimentação no diagnóstico coproparasitológico. *Lecta-USF* 2000; 18:65-73.
- 19- Kobayashi J, Hasegawa H, Forli AA, Nishimura NF, Yamanaka A, Shimabukuro T, et al. Prevalence of intestinal parasitic infection in five farms in Holambra, São Paulo, Brazil. *RevInstMedTropSao Paulo* 2005; 37:13-18.

Tabela 1: Validação da técnica de Hematoxilina férrica em relação a coloração de Lugol.

<b>Hematoxilina férrica</b>	<b>Lugol</b>		<b>Total</b>
	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	
<b>Positivo</b>	42(A)	26(B)	68(A + B)
<b>Negativo</b>	0(C)	150(D)	150(C+D)
<b>Total</b>	42(A+C)	176(B+D)	218(A+B+C+D)

Sensibilidade:  $a/a+b = 42/42 = 100\%$

Especificidade:  $d/b+d = 150/176 = 85\%$

Valor preditivo positivo=  $a/(a+b) = 42/68 = 61\%$

Valor preditivo negativo=  $d/(c+d) = 150/150 = 100\%$

Tabela 2: Validação da técnica de Ziehl-Neelsen em relação a coloração de Lugol.

Ziehl-Neelsen	Lugol		Total
	Positivo	Negativo	
<b>Positivo</b>	42(A)	32(B)	74(A + B)
<b>Negativo</b>	0(C)	144(D)	144(C+D)
<b>Total</b>	42(A+C)	176(B+D)	218(A+B+C+D)

Sensibilidade:  $a/a+b = 42/42 = 100\%$

Especificidade:  $d/b+d = 144/176 = 81\%$

Valor preditivo positivo =  $a/(a+b) = 42/74 = 56\%$

Valor preditivo negativo =  $d/(c+d) = 144/144 = 100\%$