

CETESB	HELMINTOS E PROTOZOÁRIOS PATOGÊNICOS CONTAGEM DE OVOS E CISTOS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS Método de ensaio	L5.550 OUT/89
--------	--	------------------

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Normas complementares.....	2
3 Definições.....	3
4 Aparelhagem.....	4
5 Execução do ensaio.....	7
6 Resultados.....	18
Anexo A - Esquema de procedimento.....	21
Anexo B - Referências bibliográficas.....	23

INTRODUÇÃO

Definem-se como enteroparasitas todos os protozoários e helmintos que parasitam o trato intestinal humano e de outros animais, os quais são liberados no meio ambiente através das fezes dos indivíduos infectados. A contaminação do solo por esses parasitas está associada diretamente ao destino dado aos excretas humanos e de animais, refletindo as condições higiênicas e de saneamento da população. Nesse sentido, a utilização de fezes humanas e animais, lixo e esgoto doméstico como fertilizantes de solos, bem como sua irrigação com águas residuárias altamente contaminadas, constituem um problema significativo para a saúde pública, visto que o solo pode tornar-se um veículo na transmissão desses patógenos. Além disso, deve-se considerar também a possibilidade de contaminação das águas, em consequência do carreamento desses agentes patogênicos para corpos hídricos através da drenagem por águas pluviais.

Os protozoários patogênicos de maior importância em águas de esgoto e águas de consumo humano contaminadas são Giardia lamblia, Entamoeba histolytica e Criptosporidium, que causam diarreia ou gastroenterites de severidade variada. O Criptosporidium causa uma diarreia similar à da cólera, que assume maior gravidade em indivíduos imunodeficientes. O Balantidium coli, um protozoário existente no intestino grosso de suínos, pode também parasitar o homem em algumas situações.

Em relação aos helmintos, verifica-se a ocorrência em nosso país de

uma ampla gama de parasitoses intestinais, destacando-se pela elevada prevalência: Ascaris lumbricoides (59,5% da população nacional) e os ancilostomídeos (principalmente Necator americanus), com taxas da ordem de 26,5% segundo dados da Organização Mundial da Saúde (1987). Destaca-se também a ocorrência de Trichuris trichiura, Strongyloides stercoralis, Enterobius vermicularis, Taenia solium e T. saginata, Schistosoma mansoni, Hymenolepis nana e H. diminuta.

O conhecimento do tempo de sobrevivência de patógenos no solo é relevante em todas as situações em que esgoto, lodo ou compostos orgânicos de origem fecal são aplicados como fertilizantes ou condicionadores do solo. De modo geral, os cistos de protozoários podem resistir 10 dias ou mais no solo (Entamoeba histolytica < 20 dias a temperaturas de 20 a 30°C). A resistência dos ovos de helmintos varia bastante, sendo os mais resistentes os ovos de Ascaris, que podem permanecer viáveis durante até 7 anos. Em águas doces, o tempo de sobrevivência de E. histolytica é inferior a 30 dias e dos ovos de Ascaris lumbricoides é de vários meses, a temperaturas de 20 a 30°C. Os cistos de Giardia lamblia, que são eliminados na proporção de 10⁶/g de fezes do indivíduo infectado, podem sobreviver até 2 meses em águas potáveis.

Devido à ampla ocorrência em nosso país de enteroparasitoses na população humana e animal e à resistência apresentada por cistos de protozoários e ovos de alguns helmintos, a pesquisa desses patógenos em amostras de água de esgoto, solo e resíduos sólidos é recomendada em estudos e programas de avaliação e monitoramento da qualidade ambiental, visando minimizar a disseminação dos parasitas intestinais no meio-ambiente.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve os métodos de quantificação e identificação de ovos de helmintos e cistos de protozoários em amostras ambientais sólidas e líquidas pelas técnicas de centrífugo-flutuação e de sedimentação espontânea, sendo aplicável para amostras de solo, areia, resíduos sólidos e água de esgoto.

2 NORMAS COMPLEMENTARES

Na aplicação desta Norma é necessário consultar:

- a) M1.001 - Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratório de microbiologia;

- b) L5.009 - Segurança e higiene do trabalho em laboratório de microbiologia.

3 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 3.1 a 3.8.

3.1 Helmintos

Grupo extremamente grande na natureza, que engloba todos os vermes, quer sejam parasitas (humanos, animais ou vegetais) ou organismos de vida livre. Possuem forma e tamanho variados. São divididos em três filos, dos quais apenas Platyhelminthes e Nemathelminthes apresentam interesse em parasitologia humana.

3.2 Platyhelminthes

Os platelmintos são vermes achatados dorsoventralmente. Esse filo apresenta 2 classes de interesse médico (Trematoda e Cestoda), que incluem em os seguintes enteroparasitas humanos e animais: Shistosoma e Fasciola (trematódeos), Taenia solium, Taenia saginata, Hymenolepis nana, Hymenolepis diminuta, Dipylidium caninum (cestódeos).

3.3 Filo Nemathelminthes

Os nematelmintos são vermes com corpo alongado, de forma cilíndrica. Este filo apresenta duas classes: Nematoda, que engloba grande número de espécies extremamente importantes em parasitologia humana e veterinária, e Nematomorfa, que inclui apenas vermes de vida livre, sem interesse médico-veterinário. Entre os nematóides, são as seguintes as espécies de enteroparasitas humanos e animais: Ascaris lumbricoides, Toxocara canis, Enterobius vermicularis, Strongyloides stercoralis, Trichuris trichiura, e os ancilostomídeos.

3.4 Protozoários

Neste grupo são incluídos todos os organismos animais unicelulares, eucariotos. Todo protozoário é constituído basicamente por uma membrana, que envolve o citoplasma, contendo o núcleo. Os protozoários apresentam as mais variadas formas, tipos de alimentação e de locomoção. Dentro deste grupo, apresentam interesse, como enteroparasitas humanos, as seguintes espécies: Giardia lamblia, Entamoeba histolytica, Balantidium coli e Criptosporidium sp.

3.5 Trofozoíto

Forma ativa dos protozoários, em que eles se alimentam e se reproduzem.

3.6 Cisto

Forma de resistência dos protozoários. Para a passagem para a forma cística, o protozoário secreta uma parede resistente (parede cística), que o protegerá quando estiver em meio impróprio ou em fase de latência.

3.7 q.s.p

Quantidade suficiente para.

3.8 rpm

Rotações por minuto.

4 APARELHAGEM

4.1 Equipamentos

4.1.1 Agitador tipo Vortex.

4.1.2 Autoclave

É normalmente operada a uma pressão de 103 393 Pa (1,05 kgf/cm² ou 15 lb/pol²), produzindo, em seu interior, uma temperatura de 121,6°C ao nível do mar. Em seu funcionamento, deve-se observar a substituição por vapor de todo ar existente na câmara e sua operação completa deve durar no máximo uma hora, sendo recomendável que a temperatura de esterilização seja atingida em até 30 minutos.

4.1.3 Balança

Com sensibilidade mínima de 0,1 g ao pesar 150 g.

4.1.4 Centrífuga

Para ser operada a 2 500 rotações por minuto.

4.1.5 Câmara de Sedgwick-Rafter (S-R)

Com capacidade de 1 mL; essas câmaras apresentam 20 mm de largura por 50 mm de comprimento e 1 mm de profundidade.

4.1.6 Densímetro

Para leitura da densidade de 1,180.

4.1.7 Destilador de água ou aparelho para desionização

Deve produzir água não tóxica, cuja condutividade deve ser inferior a 2 µS/cm e o pH estar na faixa de 5,5 a 7,5.

4.1.8 Estufa para esterilização e secagem

Deve manter a temperatura na faixa de $(170 \pm 10)^{\circ}\text{C}$, durante o período de esterilização de materiais (mínimo de duas horas).

4.1.9 Microscópio binocular

Com oculares de 10x e objetivas de 10x, 40x e 100x (imersão).

4.2 Materiais

4.2.1 Adaptador de borracha (pera de sucção)

4.2.2 Alça de inoculação

De platina, platina-irídio ou níquel-cromo, com aproximadamente 7 a 8 cm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro, apresentando na extremidade de uma parte encurvada, formando um aro perpendicular à agulha. É colocada em cabo de metal ou madeira (cabo de Kolle) (Ver Figura 1).

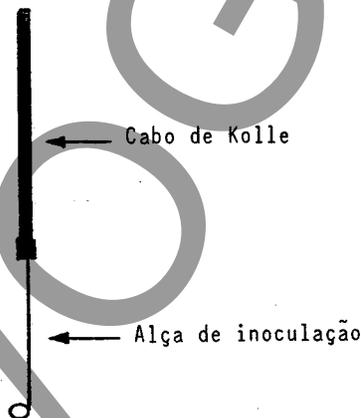


FIGURA 1 - Alça de inoculação com cabo de Kolle

4.2.3 Algodão

4.2.4 Bandejas de plástico ou aço inoxidável

4.2.5 Bico de Bunsen

4.2.6 Detergente aniônico

4.2.7 Estantes para tubos de centrífuga

4.2.8 Fita crepe

4.2.9 Gaze cirúrgica

4.2.10 Luvas de borracha

4.2.11 Máscaras cirúrgicas

4.2.12 Micrômetro

Lâmina de vidro, gravada com escala com divisões de 0,1 e 0,01 mm.

4.2.13 Pinça dente de rato

4.2.14 Pera de sucção

4.2.15 Pipetadores de segurança

4.2.16 Retículo de Whipple

Pequeno disco de vidro, gravado com 10 linhas paralelas eqüidistantes na horizontal e 10 na vertical, formando um total de 100 quadradinhos iguais, dos quais um é subdividido em 25 quadrados menores iguais (ver Figura 2, pg. 15). É adaptado à ocular do microscópio. Suas medidas são obtidas através da calibração com micrômetro, sendo específicas para cada ocular e objetiva empregadas.

4.2.17 Tela metálica

Com 150 a 180 malhas por cm².

4.2.18 Tubos de centrífuga, de vidro ou plástico, com capacidade de 100 mL

4.2.19 Tubo cônico, de vidro ou plástico, com capacidade de 500 mL

4.3 Vidraria

4.3.1 Balões

De borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com capacidade de 1 000 mL, a serem utilizados na preparação de soluções.

4.3.2 Bastão de vidro

4.3.3 Béqueres

De borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com capacidade de 1 000 mL.

4.3.4 Frascos de Erlenmeyer

De borossilicato (pyrex) ou vidro neutro, com capacidades de 200 mL e 2 000 mL.

4.3.5 Frascos para coleta de amostras

De vidro neutro, ou plástico autoclavável atóxico, com capacidades varia

das, boca larga e tampa à prova de vazamento.

4.3.6 Frascos com capacidades de 200, 500 e 1 000 mL, com tampa, para armazenamento de soluções

4.3.7 Frasco de vidro âmbar de 100 mL, com tampa

4.3.8 Funil de vidro ou plástico

4.3.9 Lâminas de vidro

4.3.10 Lamínulas

4.3.11 Pipetas tipo Mohr

4.3.12 Pipetas tipo Pasteur

4.3.13 Provetas graduadas

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Princípio do método de centrífugo-flutuação

Este método, que é mais comumente empregado para a detecção de ovos leves de helmintos e cistos de protozoários, envolve a adição de uma solução de sulfato de zinco (com densidade de 1,180) à amostra previamente concentrada através de centrifugação. Baseia-se no princípio de que os ovos e larvas de helmintos e os cistos de protozoários, que forem mais leves (densidade inferior a 1,180), flutuarão na superfície da solução de sulfato de zinco, de onde serão coletados para posterior identificação microscópica.

5.2 Princípio do método de sedimentação

O método baseia-se no princípio de que ovos pesados de parasitas, tais como trematodas, cestodas e ovos inférteis de Ascaris lumbricoides, podem ser recuperados de amostras, através da técnica de sedimentação, para a qual volumes determinados de amostra são colocados em tubos cônicos e, após um período determinado de repouso, o sedimento é recolhido e observado ao microscópio.

5.3 Reagentes

5.3.1 Para a preparação das soluções utilizadas neste ensaio, são necessários os seguintes reagentes:

- a) água destilada;
- b) cloreto de magnésio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$);
- c) fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a.;
- d) hidróxido de sódio (NaOH) p.a.;

- e) iodeto de potássio (KI) p.a.;
 f) iodo em pó (I_2) p.a.;
 g) sulfato de zinco ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$).

5.4 Soluções

5.4.1 Água de diluição

Fórmula:

Solução-estoque A.....	1,25 mL
Solução-estoque B.....	5,00 mL
Água destilada q.s.p.....	1 000,0 mL
pH final após esterilização: $7,2 \pm 0,1$	

5.4.1.1 Fórmula da solução-estoque A

Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) p.a.....	34,0 g
Água destilada q.s.p.....	1 000,0 mL

5.4.1.2 Preparo da solução-estoque A

Dissolver o fosfato monopotássico em 500 mL de água destilada, ajustar pH para $7,2 \pm 0,1$ com solução de hidróxido de sódio e completar o volume para 1 000 mL com água destilada. Distribuir, em frascos com tampa de rosca, volumes que sejam adequados à necessidade de uso do laboratório. Esterilizar em autoclave a $121^\circ C$ durante 15 minutos. Armazenar a $4^\circ C$.

5.4.1.3 Fórmula da solução-estoque B

Cloreto de magnésio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$).....	81,1 g
Água destilada q.s.p.....	1 000,0 mL

5.4.1.4 Preparo da solução-estoque B

Pesar 81,1 g de cloreto de magnésio, colocar em um balão volumétrico. Acrescentar um pequeno volume de água destilada e, após dissolução, completar o volume para 1 000 mL. Distribuir, em frascos com tampa de rosca, volumes que sejam adequados à necessidade de uso do laboratório. Armazenar a $4^\circ C$.

5.4.1.5 Preparo final da água de diluição

Adicionar 1,25 mL da solução-estoque A e 5 mL da solução-estoque B a 1 000 mL de água destilada. Distribuir, em frasco de diluição, quantidades adequadas que assegurem, após autoclavação a $121^\circ C$ durante 15 minutos, volumes de 90 ± 2 mL. Armazenar à temperatura ambiente.

Nota: Antes da utilização da solução-estoque A, deve-se verificar se

não há quaisquer evidências de contaminação microbiana (turbidez, presença de material em suspensão). Em caso afirmativo, essa solução deve ser descartada.

5.4.2 Solução de lugol

Fórmula:

Iodeto de potássio cristalizado (KI).....	4,0 g
Iodo em pó (I ₂).....	2,0 g
Água destilada q.s.p.....	100,0 mL

Preparo:

Pesar 4,0 g de iodeto de potássio cristalizado e triturar em gral até reduzi-lo a um pó fino. Após a trituração, dissolver o iodeto de potássio em 20 mL de água destilada. Adicionar 2,0 g de iodo em pó à mistura. Agitar e completar o volume para 100 mL com água destilada. Distribuir a solução em frasco de vidro âmbar e deixar em repouso durante 4 dias antes do uso. Esta solução mantém-se estável durante 6 meses.

Nota: Quando for necessário utilizar a solução imediatamente após a preparação, filtrar em papel de filtro a quantidade necessária para uso.

5.4.3 Solução do hidróxido de sódio (NaOH) 1 N

Fórmula:

Hidróxido de sódio (NaOH) p.a.....	40,0 g
Água destilada q.s.p.....	1 000,0 mL

Preparo:

Pesar 40 g de hidróxido de sódio, colocar em um balão volumétrico e completar o volume para 1 000 mL com água destilada. Homogeneizar bem até a completa dissolução do hidróxido de sódio.

5.4.4 Solução de sulfato de zinco a 33% (densidade: 1,180)

Fórmula:

Sulfato de zinco (ZnSO ₄ .7H ₂ O).....	331 g
Água destilada.....	1 000 mL

Preparo:

Pesar 331 g de sulfato de zinco e dissolver em 1 000 mL de água destilada. Homogeneizar até completa dissolução do reagente. Após a dissolução e utilizando um densímetro, verificar a massa específica

que deverá ser de 1,180. Caso não esteja na densidade requerida, corrigir com sulfato de zinco ou água destilada. Armazenar em frasco de vidro bem vedado.

Nota: Esta solução mantém-se estável durante um período de 6 meses.

5.5 Amostragem

O programa de amostragem deverá ser cuidadosamente planejado, devendo ser definidos os locais para coleta e o número adequado de amostras, em função dos objetivos específicos de cada estudo.

5.5.1 Amostras

A coleta de amostras líquidas deve ser efetuada conforme descrito no Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água (CETESB-SEMA), sendo requerido um volume mínimo de 1 000 mL. Para amostras sólidas é recomendável um mínimo de 100 g do material (solo, areia, lodo, lixo, etc.), o qual deve ser coletado com auxílio de uma espátula esteril e colocado em frascos de boca larga, com tampa rosqueada, previamente esterilizados. Sacos plásticos resistentes e esterilizados também podem ser utilizados para essa finalidade. Para amostras de solo e areia, o material deve ser coletado de sua parte superficial e, visando a maior representatividade das amostras, é recomendável a delimitação prévia de uma área (por ex.: 1 m²), sendo efetuada a coleta de várias subamostras para compor o mínimo de 100 g requeridos para a análise. Para todas as amostras deve ser observado o disposto em 5.5.1.1 e 5.5.1.2.

5.5.1.1 Identificação: a amostra deve ser bem identificada e todas as informações sobre a mesma devem ser completas (nº da amostra), data da coleta, local e outras informações necessárias para que os resultados possam ser interpretados corretamente.

5.5.1.2 Transporte e preservação: após a coleta, as amostras deverão ser transportadas sob refrigeração (4 a 10°C) e enviadas ao laboratório o mais rápido possível. O tempo entre a coleta da amostra e o início da análise não deve, preferencialmente, exceder 24 horas para amostras de água de esgoto e 48 horas para amostras sólidas (resíduos sólidos, solo, areia, sedimento, etc.).

5.6 Procedimento

Notas: a) Todas as amostras devem ser tratadas como suspeitas de estarem contaminadas, devendo ser manipuladas com uso de pipetadores de segurança, luvas, máscaras, pinças, devendo

ser obedecidas todas as técnicas de assepsia.

- b) Recomenda-se que todos os materiais e vidraria utilizados na execução das análises sejam previamente esterilizados e, após o uso, descontaminados por autoclavação a 121°C durante 30 minutos, ou por um processo de desinfecção adequado.

5.6.1 Preparo das amostras sólidas

5.6.1.1 Homogeneizar lentamente a amostra de solo, sedimento ou lodo de esgoto, com auxílio de um bastão de vidro.

5.6.1.2 Utilizando uma pinça dente de rato ou tela metálica, remover os detritos presentes na amostra, tais como pedras, gravetos, tampas, etc.

5.6.1.3 Pesar 100 g da amostra ou a quantidade disponível.

5.6.1.4 Transferir o material já pesado para um frasco de Erlenmeyer contendo água de diluição em volume suficiente para permitir uma boa homogeneização da amostra. Dependendo do tipo de amostra, principalmente se a mesma apresentar substâncias gordurosas em sua composição, será necessário realizar uma centrifugação como pré-lavagem, utilizando um detergente aniônico na concentração de 0,01%. O detergente atuará como dispersante da camada gordurosa, liberando os ovos e larvas que porventura possam estar aderidos à película oleosa. Após esse procedimento, dar continuidade ao exame, segundo 5.6.4 e 5.6.5.

5.6.2 Preparo das amostras líquidas

5.6.2.1 Homogeneizar lentamente a amostra.

5.6.2.2 Com auxílio de um funil, filtrar 1 000 mL da amostra, fazendo-a passar através de gaze cirúrgica dobrada quatro vezes. Recolher o filtrado em béquer de 1 000 mL.

5.6.3 Exame das amostras

Após as amostras terem sido preparadas segundo 5.6.1 ou 5.6.2, proceder ao exame das mesmas, empregando as técnicas de centrífugo-flutuação (para detecção de ovos leves de helmintos) e de sedimentação para detecção de ovos pesados de helmintos).

5.6.4 Técnica de centrífugo-flutuação

5.6.4.1 Distribuir volumes de 100 mL da amostra preparada (segundo 5.6.1 ou 5.6.2) em 5 tubos de centrífuga de 100 mL, identificados com o número da amostra.

5.6.4.2 Pesar os tubos e, utilizando água de diluição, efetuar os ajustes necessários para que os tubos fiquem com o mesmo peso.

5.6.4.3 Centrifugar as subamostras a 2 500 rpm durante 5 minutos.

5.6.4.4 Descartar o líquido sobrenadante, tomando cuidado para não desprender o sedimento.

5.6.4.5 Adicionar 50 mL de água de diluição ao sedimento e, com auxílio de um bastão de vidro, ressuspender o material até desfazer completamente o sedimento, tornando a suspensão homogênea.

5.6.4.6 Completar o volume do tubo (100 mL) com água de diluição; misturar bem.

5.6.4.7 Centrifugar novamente a amostra a 2 500 rpm durante 5 minutos.

5.6.4.8 Descartar o líquido sobrenadante.

5.6.4.9 Repetir as operações descritas em 5.6.4.5 a 5.6.4.8 tantas vezes quantas forem necessárias, até que o líquido sobrenadante se apresente claro.

5.6.4.10 Juntar os sedimentos dos 5 tubos em um ou mais tubos de centrífuga, lavando bem as bordas dos tubos.

Nota: Para obter-se uma boa flutuação dos ovos, recomenda-se que a massa final do sedimento não ultrapasse 20 g.

5.6.4.11 Adicionar ao sedimento total 50 mL de solução de sulfato de zinco a 33% ($d = 1,180$).

5.6.4.12 Homogeneizar bem o sedimento com um agitador tipo Vortex ou manualmente e, a seguir, adicionar mais solução de sulfato de zinco, completando o volume do tubo, tomando cuidado para não o encher completamente (deixar um espaço vazio de, no mínimo, 1 cm).

5.6.4.13 Centrifugar a 2 500 rpm, durante 5 minutos.

5.6.4.14 Após a centrifugação, preparar a amostra para exame microscópico direto (ver 5.6.6 e 5.6.7) ou contagem em câmara de Sedgwick-Rafter (ver 5.6.8).

5.6.5 Técnica de sedimentação

5.6.5.1 Distribuir um volume de 500 mL da amostra em tubo cônico.

5.6.5.2 Deixar a amostra em repouso para sedimentação durante um período de 24 horas.

5.6.5.3 Após a sedimentação, preparar a amostra para exame microscópico

cópico direto (ver 5.6.6 e 5.6.7) ou contagem em câmara de Sedgwick-Rafter (5.6.8).

5.6.6 Preparo de lâminas para exame microscópico

5.6.6.1 Para as amostras processadas pela técnica de centrífugo-flutuação (ver 5.6.4) proceder conforme descrito a seguir:

- a) após a centrifugação, com auxílio de uma alça de inoculação devidamente flambada e resfriada (ver 4.2.2), retirar cuidadosamente porções da película superficial do sobrenadante;
- b) depositar cada porção desse material sobre uma lâmina de vidro;

Nota: Como os ovos de helmintos ficam concentrados na película superficial, é necessário examinar toda essa película, devendo ser preparadas, no mínimo 4 a 5 lâminas por tubo.

- c) adicionar uma gota de solução de lugol (ver 5.4.2) ao material de metade dessas lâminas; manter as outras sem coloração;
- d) cobrir o material de cada lâmina com lamínula;
- e) examinar ao microscópio, segundo descrito em 5.6.7.

5.6.6.2 A leitura ao microscópio deverá ser realizada dentro do prazo máximo de uma hora após a preparação das lâminas, devido ao fato dos ovos de helmintos se desintegrarem em contato com a solução de sulfato de zinco empregada na preparação dessas amostras. Para a diferenciação de amebas patogênicas e amebas de vida livre, deve-se utilizar a coloração com hematoxilina férrica, que evidencia com melhor nitidez as estruturas internas, facilitando a identificação.

5.6.6.3 Para as amostras processadas pela técnica de sedimentação (ver 5.6.5), proceder conforme descrito a seguir:

- a) após o período de sedimentação, introduzir, com cuidado, uma pipeta Pasteur até o fundo do tubo e recolher uma porção do material sedimentado. Para isto, o bocal da pipeta Pasteur deverá ser pressionado pela ponta do dedo do operador ou ser utilizada para de sucção, para facilitar a aspiração do material;
- c) depositar o material sobre uma lâmina.
- c) repetir essas operações até que todo o sedimento seja re

movido;

- d) corar metade do número dessas lâminas com uma gota de solução de lugol; ~~manter as outras sem coloração;~~
- e) cobrir o material de cada lâmina com lamínula.
- f) examinar ao microscópio, segundo descrito em 5.6.7.

5.6.7 Leitura ao microscópio

5.6.7.1 Realizar as leituras com auxílio de um microscópio binocular, percorrendo todo o campo da lâmina (no sentido horizontal ou vertical), utilizando oculares com aumento de 10 vezes e objetivas de 10 e 40 (ou 100 vezes, se necessário).

5.6.7.2 Proceder à identificação dos organismos presentes na amostra, com auxílio de literatura especializada, registrando as espécies identificadas e a quantidade das mesmas em fichas de leitura.

5.6.8 Exame microscópico utilizando câmara de contagem de Sedgwick-Rafter (S-R)

5.6.8.1 O microscópio binocular comum a ser utilizado para essa contagem deve ser equipado com retículo de Whipple, o qual deverá ser previamente calibrado com auxílio de micrômetro, para a ocular e as diferentes objetivas que serão utilizadas durante o exame microscópico.

5.6.8.2 Para proceder à calibração, o micrômetro é colocado na platina do microscópio e superposto a um dos lados do retículo. Dessa maneira, mede-se o lado do retículo. A partir dessa medida, pode-se obter sua área, o valor de sua menor divisão e finalmente calcular qual a parcela da câmara de contagem que será examinada e determinar, a partir da contagem nessa parcela, o número de organismos por unidade de volume. Exemplo:

Em um microscópio binocular, usando-se objetiva de 16x e ocular de 10x, foi medido o lado do retículo de Whipple, com auxílio de um micrômetro, cuja divisão é de 10 μm , e o valor obtido foi de 410 μm . Como cada lado do retículo apresenta 10 divisões, cada quadrado do retículo de Whipple medirá 41 μm de lado e, conseqüentemente, a menor divisão de cada quadrado terá 8,2 μm de lado (ver Figura 2).

Nota: As medidas obtidas neste exemplo serão utilizadas nesta Norma, sempre que necessário.

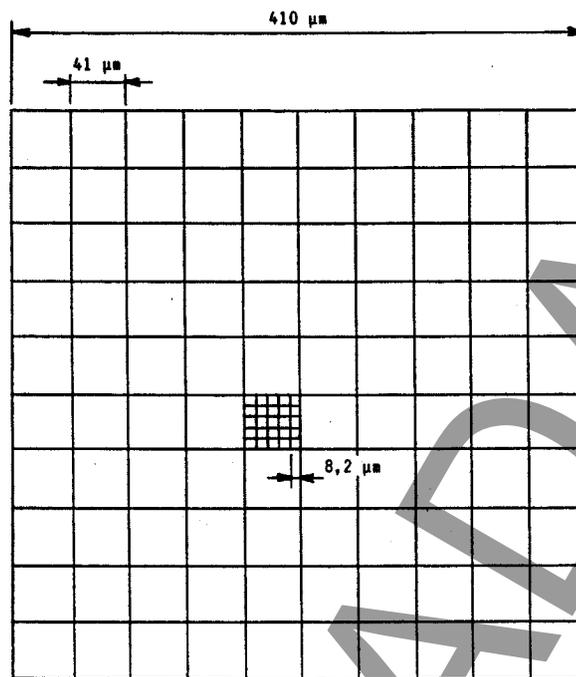


FIGURA 2 - Retículo de Whipple, com as medidas obtidas para o exemplo de 5.6.8.2 (ocular 10x, objetiva 16x)

5.6.8.3 O número de câmaras de Sedgwick-Rafter (S-R) a serem preparadas será dependente do:

- volume de toda película superficial do sobrenadante que deverá ser examinada, se a técnica empregada for a de centrifugo-flutuação;
- volume do sedimento formado, se a técnica empregada for a de sedimentação.

5.6.8.4 Colocar uma lamínula em posição diagonal sobre cada câmara de S-R a ser preparada, para evitar a formação de bolhas de ar (ver Figura 3).

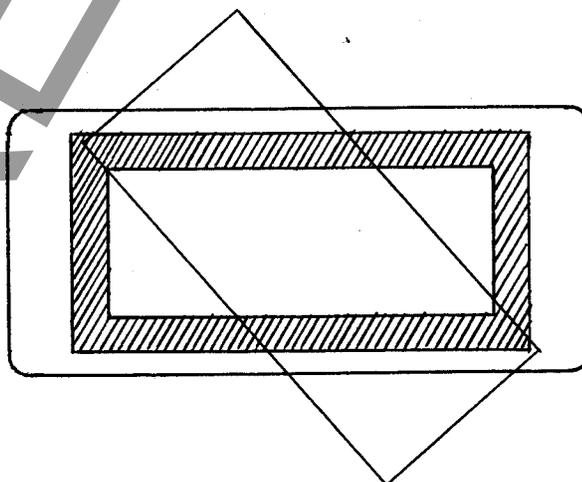


FIGURA 3 - Câmara de Sedgwick-Rafter (S-R)

5.6.8.5 Colocar uma gota de solução de lugol no interior de metade dessas câmaras de S-R.

5.6.8.6 Com auxílio de uma pipeta, transferir 1 mL da amostra (processada pelas técnicas de centrífugo-flutuação, segundo 5.6.4, ou de sedimentação, segundo 5.6.5) para o interior da câmara de S-R, até preenchê-la totalmente.

Nota: Se, no preparo da amostra, for utilizada solução de sulfato de zinco (técnica de centrífugo-flutuação), retirar o volume de 1 mL da película superficial do sobrenadante; para a técnica de sedimentação, retirar o material sedimentado.

5.6.8.7 Após o preenchimento da câmara com a amostra, recolocar a lamínula na posição adequada.

5.6.8.8 Agitar lentamente a câmara de S-R, com movimentos desordenados, para distribuição homogênea do material.

5.6.8.9 Deixar a câmara de S-R em repouso durante alguns minutos para sedimentação do material.

5.6.8.10 Efetuar uma primeira leitura ao microscópio, percorrendo toda a área da câmara de S-R, em sentido horizontal ou vertical, utilizando inicialmente ocular e objetivas de pequeno aumento e, a seguir, objetivas de aumentos maiores.

5.6.8.11 Efetuar a contagem, observando que:

- a) se a densidade de ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários for baixa, a leitura deverá ser realizada em toda a área da câmara S-R;
- b) se a densidade de ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários for elevada, escolher para leitura uma ou várias faixas (no sentido horizontal ou vertical) que apresentarem distribuição representativa desses organismos;
- c) se o número de ovos de helmintos ou cistos de protozoários do mesmo gênero ou espécie for superior a 10 em um campo do retículo de Whipple, realizar a contagem em 10 campos representativos.

5.6.8.12 Calcular a densidade de cada espécie ou gênero identificado (nº de organismos por mL), observando que:

- a) se a contagem for efetuada em toda a câmara, a densidade

será o próprio número de organismos de cada espécie ou gênero identificados/mL, visto que o volume da câmara é de 1 mL;

b) se a contagem for efetuada em uma faixa horizontal da câmara de S-R, proceder da seguinte maneira:

- calcular a área do retângulo escolhido para leitura, que é obtida multiplicando-se o valor do lado do retículo de Whipple (0,041 cm, para o exemplo citado em 5.6.8.2) pelo valor do comprimento da câmara (5 cm);
- dividir o valor da área total da câmara (10 cm²) pelo valor obtido para a área do retângulo examinado, para obter o fator de contagem para esse microscópio, em câmara de S-R. Sendo:

F = fator de contagem,

A = área da câmara de S-R,

a = área da faixa horizontal examinada,

obtem-se:

$$F = A/a,$$

onde:

$$A = 10 \text{ cm}^2,$$

$$a = 0,205 \text{ cm}^2;$$

daí:

$$F = 10/0,205 = 48,78$$

- o número de organismos de um mesmo gênero ou espécie presentes em 1 mL da amostra será obtido multiplicando-se esse fator pelo resultado da contagem de cada um desses organismos;

c) se a contagem for efetuada em uma faixa vertical da câmara de S-R, proceder da seguinte maneira:

- calcular a área do retângulo escolhido para leitura, que é obtida multiplicando-se o valor do lado do retículo de Whipple (0,041 cm), para o microscópio citado em 5.6.8.2), pelo valor da largura da câmara (2 cm);
- dividir o valor da área total da câmara (10 cm²) pelo valor obtido para a área do retângulo escolhido para leitura (0,082 cm²) para obter o fator de contagem para esse microscópio, em câmara de S-R. Sendo:

F = fator de contagem,

A = área da câmara de S-R,
a = área da faixa vertical examinada,

obtem-se:

$$F = A/a,$$

$$A = 10 \text{ cm}^2,$$

$$a = 0,082 \text{ cm}^2;$$

daí:

$$F = 10/0,082 = 121,95$$

- o número de organismos de um mesmo gênero ou espécie presentes em 1 mL da amostra será obtido multiplicando-se esse fator pelo resultado da contagem de cada um desses organismos;

Nota: Se a leitura for efetuada em mais de uma faixa da câmara de S-R, deve-se dividir o valor do fator de contagem pelo número de faixas examinadas (horizontais ou verticais), antes de se efetuar o cálculo do nº de organismos/mL.

- d) se a contagem for efetuada em 10 campos do retículo de Whipple, o fator de contagem será obtido dividindo-se a área da câmara de S-R pela área correspondente a 10 retículos de Whipple examinados ao acaso. Sendo:

A = área da câmara de S-R,

r = área do retículo de Whipple,

F = fator de contagem.

$$F = \frac{A}{10r},$$

onde:

$$A = 10 \text{ cm}^2,$$

$$r = 0,001681,$$

obtem-se:

$$F = \frac{10}{10 \times 0,001681} = 594,88$$

6 RESULTADOS

Os resultados são expressos pelo número de ovos e/ou larvas de helmintos ou cistos de protozoários por 1 000 mL, quando se processam

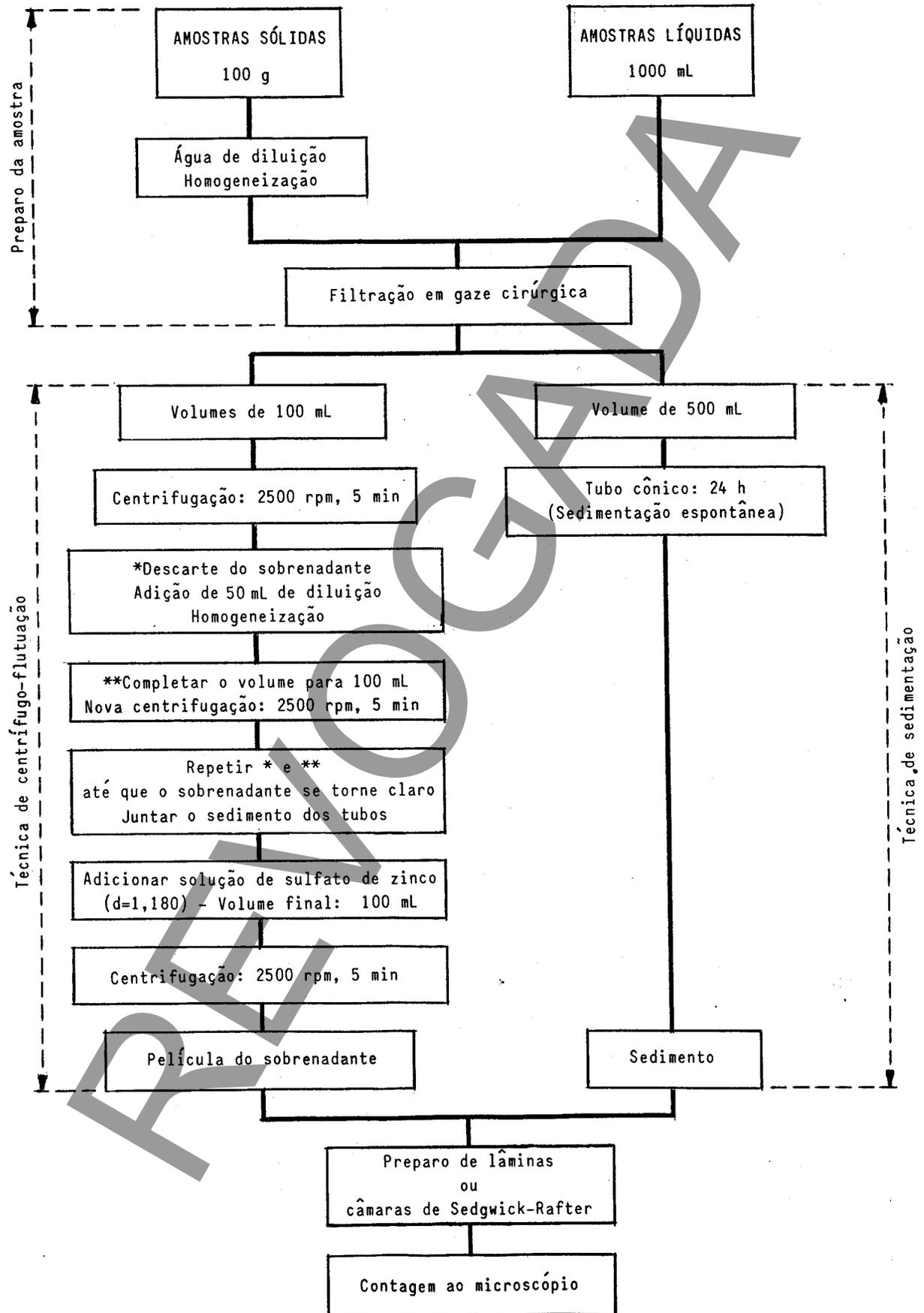
amostras líquidas, ou por 100 g, quando se processam amostras sólidas. Esse número será obtido a partir do somatório dos valores das contagens das câmaras de Sedgwick-Rafter examinadas, ou das contagens das lâminas examinadas diretamente ao microscópio, a partir da aplicação das técnicas de centrífugo-flutuação e de sedimentação.

/ANEXO A

REVOGADA

REVOGADA

ANEXO A - ESQUEMA DE PROCEDIMENTO DE EXAME PARASITOLÓGICO DE AMOSTRAS AMBIENTAIS



REVOGADA

ANEXO B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B-1 AMATO, V.N. & CORRÊA, L.L. Exame parasitológico das fezes. São Paulo, Servier, 1980, 100 p.
- B-2 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Biological examination of water. In: Standard methods for the examination of water and wastewater. 16th ed. Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1985, p. 1057-1067.
- B-3 CETESB, São Paulo. Lavagem, preparo e esterilização de materiais em laboratórios de microbiologia. 1986 (NT M1.001).
- B-4 _____. Guia de coleta e preservação de amostras de água. São Paulo, 1988.
- B-5 _____. Segurança e higiene do trabalho em laboratórios de microbiologia ambiental. São Paulo, 1986 (NT L5.009).
- B-6 FEACHEM, R.G.; BRADLEY, D.J.; GARELICK, H. & MARA, E. Sanitation and disease - Health aspects of excreta and wastewater management. New York, John Wiley & Sons, 1983. 501 p.
- B-7 LEHMANN, D.L.; WALLIS, P.M.; Mac MILLAN, A. & BUCHANAN-MAPPIN, J.M. Potential health problems caused by disposal to land of sewage sludge containing pathogens. Kananaskis Centre for Environmental Research, University of Calgary, RMD Report 83/21, 1983. 172 p.
- B-8 NEVES, D.P. Parasitologia humana. Rio de Janeiro, Livraria Atheneu, 1985, 445 p.
- B-9 PANICKER, P.V.R.C. & KRISHNAMOORTHY, K.P. Parasite egg and cyst reduction in oxidation ditches and aerated lagoons. Journal Water Pollution Control Federation, 53 (9): 1413 - 1419, 1981.
- B-10 PESSÔA, S.B. & MARTINS, A.V. Parasitologia médica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S/A., 1982. 1002 p.
- B-11 KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWELL Jr., U.R. & SOMMERS, H. M. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia, J.B. Lippincott, Co., 1979, 495 p.
- B-12 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Public health significance of intestinal parasitic infections. Bulletin of the World Health Organization, 65 (5): 575-588, 1987.