

MANUAL DE
DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO
DA
MALÁRIA

SEGUNDA EDIÇÃO



ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE
Repartição Sanitária Pan-Americana, Escritório Regional da
ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE

1964

INDEXED

MANUAL DE
DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO
DA
MALÁRIA

SEGUNDA EDIÇÃO



Publicação Científica No. 87

Setembro de 1964

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE
Repartição Sanitária Pan-Americana, Escritório Regional da
ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE
1501 New Hampshire Avenue, N. W.
Washington, D. C. 20036, E. U. A.

Preparado por:

DR. A. J. WALKER

Consultor de Parasitologia

Programa de Erradicação da Malária

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	v
------------------	---

Parte I. O parasito da malária

1. Ciclo de vida do parasito da malária	3
2. Comportamento das infecções pelo <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> no fígado do homem	5
3. O sangue em relação ao diagnóstico da malária	10
4. Comportamento geral das diferentes espécies do <i>Plasmodium</i> no sangue periférico	16
5. Características individuais das espécies no sangue periférico	20

Parte II. Preparação das lâminas de sangue

6. Preparação da gôta espessa	33
7. Teoria da coloração do sangue	36
8. Técnicas de coloração—Considerações gerais	40
9. Tratamento prévio das gôtas espessas	43
10. Técnica de coloração—Detalhes	45

Parte III. O exame microscópico

11. Microscópios	51
12. Iluminação	55
13. Técnica do exame microscópico	60
14. Registro e notificação dos resultados	63
15. Roteiro geral para o exame de lâminas coradas	66
16. Lâminas de microscopia	67

Parte IV. Serviços de laboratório

17. Serviços de laboratório	81
18. Equipamento	83

Apêndices:

<i>Os dez "pecados mortais" na microscopia da gôta espessa</i>	90
1. Microscopia da erradicação da malária	91
2. Comportamento dos gametocitos de <i>P. falciparum</i>	93
3. Glóbulos vermelhos em formato de pneumático	94
4. Diagrama para o registro de parasitos	95
5. Modelo	97
6. O fenômeno da coloração de Schüffner	98
7. Teste rápido da qualidade do corante Giemsa líquido	99
8. Técnica da coloração salina de Shute	99
9. Coloração do esfregaço de sangue	100
10. Recoloração de gôtas espessas	102
11. Coleção de lâminas para treinamento	103
12. Frascos conta-gôtas plásticos	105
13. Lápis para marcar no sangue	105
14. "Humigraph"	106
15. Como ajustar o parafuso macrométrico	107
16. Uso da objetiva demarcadora	108
17. Óleo de imersão	110
18. Tipos de lâmpadas para microscópio	112
19. Seringa de borracha	113
20. Termômetro de máxima e mínima	114
21. Fotômetro marca "Photovolt"	115
22. Revisão contínua do equipamento microscópico	116
23. Definições	117

INTRODUÇÃO

Este manual foi preparado com a finalidade principal de uniformizar as técnicas de laboratório empregadas no diagnóstico microscópico das amostras de sangue colhidas durante a campanha de erradicação da malária. Destina-se também a servir de ajuda no ensino de parasitologia ministrado pelos centros de treinamento em erradicação da malária que a RSPA/OMS patrocina ou assiste e a facilitar o trabalho dos técnicos de laboratório que têm a seu cargo o exame rotineiro de tais amostras, sobretudo transpostas as primeiras etapas da erradicação, quando a maioria das mesmas dá resultado negativo.

Nesta segunda edição, a matéria foi redistribuída e posta em quatro capítulos principais: O Parasito da Malária; A Preparação das Lâminas de Sangue; O Exame Microscópico; e Os Serviços de Laboratório. Acrescentaram-se à obra 23 apêndices contendo informações suplementares sobre equipamento e técnicas básicas, para proporcionar ao estudante esclarecimentos fáceis de encontrar.

As técnicas que aqui se recomendam são simples e foram desenvolvidas tendo em vista o emprêgo de gotas de sangue espessas. Sua adoção deverá dar como resultado não só diagnósticos mais rápidos e precisos, mas também um aumento da produção diária do microscopista.

Espera-se que este manual, pela universalidade dos princípios que defende e das recomendações que faz, bem como pela extrema simplicidade de sua linguagem, possa ser adotado em qualquer programa de erradicação da malária.

PARTE I

O parasito da malária

1. CICLO DE VIDA DO PARASITO DA MALÁRIA

O presente manual pode ser vantajosamente utilizado em conjunção com a fita intitulada *The Life Cycle of the Malaria Parasite*, editada pelo Prof. H. E. Shortt e distribuída pela firma Imperial Chemical Industries, em inglês e em espanhol. Essa película sonora e colorida mostra, esquemáticamente, o ciclo de vida do *Plasmodium* no mosquito e no homem. A parte final, que mostra o diagnóstico da malária *P. vivax* num esfregaço, é anterior aos princípios básicos adotados neste manual.

A fita sonora, em preto e branco, falada em inglês (USPHS No. M-138B, CDC, Atlanta, Geórgia), é o registro cinematográfico de um mosquito no próprio ato de picar a pele da bochecha de uma cobáia. A parte final do mesmo filme, tomada com microscopia, mostra a exflagelação do gametocito macho e a fertilização da fêmea por um dos microgametos. As gôtas espessas, que secam vagarosamente, em condições favoráveis de temperatura e umidade, podem mostrar a exflagelação parcial ou mesmo completa. Esse é o trecho do filme de maior importância para o diagnóstico.

A fêmea do mosquito *Anopheles* é compelida a picar animal de sangue quente a fim de garantir sangue para a maturação de seus ovos já fertilizados. Se esse animal é um homem com infecção bem estabelecida por uma das espécies de malária, seu sangue deverá conter formas sexuadas do parasito, bem como as formas assexuadas responsáveis pelos sintomas.

Essas formas assexuadas, ao chegarem ao estômago do mosquito, morrem rapidamente e são digeridas, mas as formas sexuadas—os gametocitos—escapam de suas hemácias hospedeiras. O gametocito macho, de tamanho menor, logo desenvolve elementos móveis, semelhantes a espermatozóides, chamados microgametos (exflagelação), que se destacam do núcleo e se movem ativamente no meio líquido circundante. O gametocito fêmea, maior, sofre o mesmo processo de maturação, o que possibilita ao microgameto, em movimento, penetrar e mover-se ativamente no citoplasma do macrogameto.

Dentro de algumas horas, desenvolve-se um oocineto, que se

move entre as células de revestimento do estômago do mosquito e vem instalar-se sob a membrana que separa as células de revestimento da sua cavidade abdominal. Ali, o material nuclear unido começa a dividir-se na grande célula, altamente refrativa, que ainda contém o pigmento original do gametocito fêmea. O oocineto encistado, agora um oocisto esférico, torna-se cada vez maior, projetando-se, mais adiante, na cavidade externa do trato intestinal do mosquito. Duas ou três semanas depois, o oocisto, dilatado por milhares de corpos diminutos semelhantes a cerdas, chamados esporozoítos, cada qual contendo um fragmento de cromatina, rompe-se e descarrega os esporozoítos maduros na cavidade abdominal, cheia de fluido, do mosquito. A corrente fluida do corpo conduz os esporozoítos ao tórax do mosquito. Em contato com as células das glândulas salivares os esporozoítos nelas penetram, para atingir depois os canais salivares, através da saliva.

O filme, que mostra o mosquito no ato da alimentação, deixa ver como a probóscida do inseto sonda repetidamente o local até alcançar a luz de um capilar ou de uma veia pequena. No ato de picar e sugar, o mosquito solta a saliva e os esporozoítos são injetados intravascularmente, como se por meio de agulha numa veia. Por subinoculação, pode-se vê-los circular durante até 10 minutos e, raras vezes, durante mais de 30 minutos. Como todo o sangue do corpo passa pelo fígado cada 3 minutos, é relativamente fácil a penetração de muitos esporozoítos nas células do fígado adjacentes aos sinusóides hepáticos cheios de sangue. Muitos são, sem dúvida, fagocitados, mas os que alcançam seu objetivo começam imediatamente a multiplicar-se no fígado, multiplicação que toma 6, 8, 9 ou 11 dias inteiros, conforme a espécie. A forma em crescimento no citoplasma de uma célula do fígado expande-se e seu núcleo divide-se repetidamente até romper-se o esquizonte maduro, semelhante a um grande quisto de forma irregular. Essa ruptura forma no fígado merozoítos, muitos dos quais acham caminho, por entre as células vizinhas, até o mais próximo sinusóide cheio de glóbulos vermelhos. Termina assim a fase pré-eritrocítica e inicia-se a eritrocítica, que produz a enfermidade. Ao fim de cada período de 48 ou 72 horas, muitos esquizontes eritrocíticos maduros se rompem e numerosos merozoítos minúsculos depressa penetram em outros glóbulos vermelhos, antes que os monocitos fagocíticos e outras células os capturem.

2. COMPORTAMENTO DAS INFECCÕES PELO P. FALCIPARUM E P. VIVAX NO FÍGADO DO HOMEM

Como as fases exoeritrocíticas dos plasmódios foram descobertas pela primeira vez em endotélio de ave, pensou-se durante muito tempo que essas fases seriam também encontradas no endotélio do homem. Tal não foi, porém, o caso. Muitos anos antes da descoberta das fases hepáticas, vistas esquematicamente no filme intitulado *Ciclo de vida do parasito da malária*, fizeram-se, na Austrália, durante a II Guerra Mundial, experiências visando determinar os efeitos exatos da droga chamada Atebrina, então bem conhecida. Essas experiências demonstraram, de maneira clara, tudo quanto ocorria nas fases exoeritrocíticas do *P. falciparum* e *P. vivax* no homem.

Tão complexos e exaustivos foram os experimentos, que apenas a localização das fases exoeritrocíticas ficou por descobrir. Empregou-se um número ilimitado de voluntários sem imunidade, numa área onde não existia a malária. Foram trazidos mosquitos e cepas de malária *vivax* e *falciparum* de áreas hiperendêmicas do Sudoeste do Pacífico. Empregou-se a subinoculação de 300 a 500 cc de sangue para demonstrar a presença ou ausência das formas infectantes na circulação periférica. Foi este o aspecto mais importante das provas, já que até aquela época apenas 10 a 50 cc haviam sido inoculados, e em poucas pessoas.

Resumidos, tanto quanto possível, os resultados obtidos foram os seguintes:

P. falciparum. Permitiu-se que mosquitos com esporozoítos demonstráveis de *falciparum* se alimentassem no braço direito de um voluntário, enquanto se retiravam, simultaneamente, 300-800 cc de sangue de uma veia do seu braço esquerdo, para injetá-lo, imediatamente depois, em outro voluntário. Em ambos os voluntários, desenvolveram-se parasitemias e sintomas, ao fim do costumeiro período de incubação, de 11 dias; mas amostra similar de sangue tirada meia hora ou mais após as picadas dos mosquitos nunca logrou infectar um segundo voluntário. A partir de então, o sangue tirado e injetado diariamente, durante 5 dias, não produziu qualquer sinal da doença no homem. Na realidade, nenhuma

subinoculação, até 144 horas depois, obteve sucesso. Isto significa que transcorreu um período completo de 6* dias inteiros, antes que o sangue da pessoa picada pudesse produzir infecção demonstrável em outra pessoa.

As subinoculações diárias continuaram a ser positivas no segundo voluntário, até que a pessoa recebesse uma dose curativa de Atebrina ou desenvolvesse imunidade suficiente para a cura espontânea. Uma vez negativos, todos esses casos assim permaneciam, mas nem por isso deixaram de ser observados durante um ano.

Por outro lado, as subinoculações semanais foram sempre positivas nos casos em que a medicação foi insuficiente, embora permanecessem sem sintomas por várias semanas ou meses antes da recaída.

Isto veio demonstrar decisivamente que houve um período nitidamente definido, de 6 dias completos, durante o qual outro tipo de desenvolvimento da infecção pelo *falciparum* teve prosseguimento fora da circulação periférica.

Demonstrou-se repetidas vezes que um indivíduo que recebia diariamente 100 mg de Atebrina durante 7 dias, antes de picado pelos mosquitos infectados com *falciparum* e, depois de picado, durante um mínimo de 3 semanas, nunca desenvolvia parasitemia ou sintomas visíveis, embora ocasionalmente as subinoculações feitas do 9° ao 13° dias fôsem positivas. Essa foi a primeira prova experimental de que um medicamento pode eliminar por completo a infecção pelo *falciparum*. Essa prova demonstrou também que 3 comprimidos de Atebrina de 100 mg cada um, administrados diariamente durante 8 dias, podem produzir a cura radical da infecção.

Embora houvesse algumas curas de casos individuais com quinina, não se podia esperar que esse medicamento produzisse a cura da malária *falciparum* em mais do que 50% dos casos. Os êxitos relatados com essa droga bem podiam ter sido auxiliados pelo desenvolvimento de um alto grau de imunidade. Prova do acerto desta observação é o virtual desaparecimento da febre hemoglobínica das regiões onde a Atebrina tomou o lugar da quinina tanto na supressão como no tratamento.

P. vivax. Experimentos semelhantes foram repetidos com a malária *vivax*, com sucesso igual mas resultados acentuadamente

* *falciparum*—6 dias; *vivax*—8 dias; *ovale*—9 dias; *malariae*—11 dias.

diferentes. As subinoculações com *vivax*, no 7° e 8° dias, eram negativas. Sòmente depois de 8 dias completos, manifestava-se a infecção nos pacientes, mesmo quando êstes eram picados simultaneamente por mosquitos infectados pelo *vivax* e mosquitos infectados pelo *falciparum*. A infecção pelo *falciparum* aparecia no 7° e 8° dias; e no 9° dia aparecia a outra.

O sangue da pessoa infectada pelo *vivax* continuava a ser positivo durante todo o acesso primário, de 3 a 5 semanas, ou até a administração de tratamento curativo. Tornava-se então negativo e as subinoculações semanais por um período de 2 a 5 meses não causaram a infecção nos voluntários. Não era senão na ocasião em que normalmente podia ocorrer uma recaída que apareciam as primeiras subinoculações positivas. Depois que uma recaída, com sua parasitemia e sintomas visíveis, cedia, as subinoculações continuavam positivas durante vários dias, para depois se tornarem negativas. Assim permaneciam até poucos dias antes da recaída seguinte, se tal ocorresse. Com a administração diária da Atebrina, como ficou acima indicado, não se verificavam parasitemias transitórias, como no caso do *falciparum*, porém, em geral, os parasitos e sintomas apareciam no paciente logo depois da supressão da droga, mesmo quando a administração desta era continuada por 3 semanas após as picadas. O tratamento curativo com a Atebrina, que se demonstrara tão eficaz no *falciparum*, sempre controlou o acesso primário e eliminou a parasitemia, mas não evitou o desenvolvimento subseqüente de uma recaída.

Nos pacientes infectados por inoculação de sangue, em vez de picadas de mosquitos, a situação era bem diferente; êsses indivíduos recebiam sòmente as formas eritrocíticas assexuadas. Enquanto essas formas persistiam no sangue, as subinoculações eram positivas, embora o número de parasitos no sangue inoculado fôsse submicroscópico. Os pacientes com *falciparum* ou *vivax* curavam-se prontamente com menores quantidades da droga; e, uma vez negativos às subinoculações, assim permaneciam. Tais experiências demonstraram, sem sombra de dúvida, que havia uma fase pre-eritrocítica, de 6 dias de duração na infecção *falciparum*, após a qual esta desaparecia, aparentemente, por completo; e que, uma vez eliminada a subseqüente infecção assexuada, o paciente ficava completamente curado.

Na infecção por esporozoítos de *vivax*, a fase pre-eritrocítica durava 8 dias completos. Contudo, é evidente que ela não desaparecia por completo, porque, após um período no qual nenhuma

forma circulante podia ser encontrada no sangue, se verificava com freqüência, embora não constantemente, uma ou mais repetições de parasitemia e atividade clínica. Isso nunca se verificou quando a infecção era introduzida por injeções de sangue. As deduções feitas dessas experiências sugeriram a existência de uma *fase oculta de desenvolvimento*, que produz no *falciparum* merozoítos que infectam somente os glóbulos vermelhos e nada mais, enquanto que no *vivax* essa fase oculta produz, segundo parece, merozoítos infectantes não só para os glóbulos vermelhos mas também para algumas células capazes de mantê-los em lugar até agora desconhecido.

A acentuada diferença no comportamento exoeritrocítico do *falciparum* e do *vivax* justifica a criação de um novo gênero: *Laverania*. Portanto, o *P. falciparum* poderá vir a ser assim chamado: *L. falcipara*.

Os pontos seguintes são baseados nos conceitos das experiências acima descritas:

1. A malária *falciparum* é totalmente curável com uma única dose de medicamento apropriado.
2. Nem tôdas as infecções *vivax* produzem recaídas; os casos que não as produzem podem chegar a 30%.
3. A medicação capaz de eliminar a infecção *falciparum* não elimina as recaídas da *vivax*. Estas, quando ocorrem, raramente persistem por mais de 3 anos.
4. A medicação supressiva prolongada pode erradicar a malária *falciparum*, mas a do *vivax* pode reaparecer clinicamente, quando a medicação é suprimida.

Ao que parece, a idéia de procurar no fígado essas fases ocultas deriva de observação feita por Garnham na África Ocidental. Garnham notou pequenas vesículas na superfície de fígado de macacos cujo sangue continha gametocitos de *Hepatocystis kochi*. Esses cistos, que mais tarde demonstraram conter numerosos merozoítos, nunca foram encontrados em animais não infectados.

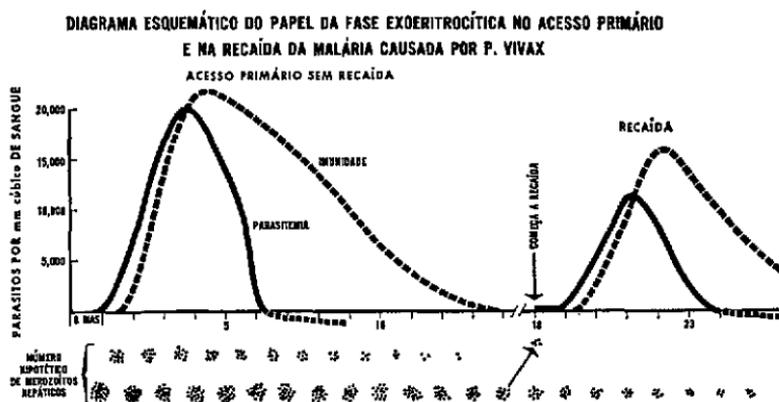
As fases hepáticas foram demonstradas pela primeira vez por Shortt e Garnham, num macaco infectado pelo *P. cynomolgi* e pouco depois no homem, numa infecção provocada pelo *P. vivax*. A fase hepática do *P. falciparum* no homem foi demonstrada na Inglaterra e pouco depois na América. Em 1953, foi demonstrado que o *P. ovale* tinha uma fase hepática de 9 dias. Em 1959, Bray verificou que a fase hepática do *P. malariae* pode durar 11 dias.

Nas quatro espécies, as fases hepáticas têm aspectos semelhantes. As formas mais jovens são encontradas no citoplasma de uma única célula do fígado; a cromatina divide-se por fissão binária. Quando maduros os esquizontes do *vivax*, *malariae* e *ovale* contêm centenas de merozoítos, enquanto que o esquizonte do *falciparum* pode conter milhares. O único dano que causam ao fígado é, aparentemente, a compressão de algumas células adjacentes, pois não se viu nenhuma infiltração celular reacionária. Quando o cisto se rompe, os merozoítos desprotegidos insinuam-se nas células adjacentes do fígado até encontrarem um sinusóide que contenha glóbulos vermelhos. Dêsse momento em diante, começa a fase eritrocítica.

Outro plasmódio do macaco, o *P. knowlesi*, que tem um ciclo eritrocítico de 24 horas e uma fase pré-eritrocítica de 5 dias e meio, tem sido repetidamente usado para infectar artificialmente o homem.

Em 1960-63, foram estudadas mais de 100 infecções do homem com *P. cynomolgi* e outras espécies de malária do macaco.

DIAGRAMA 1



O diagrama esquemático acima (Diagrama 1), completamente imaginário, é uma tentativa no sentido de explicar o papel da fase exoeritrocítica da malária *vivax* em:

1. um acesso primário sem recaída;
2. uma recaída em seguida a um acesso primário.

A linha cheia mostra a parasitemia medida pela escala à esquerda. O nível de parasitos é submicroscópico onde a linha se torna interrompida. A linha pontilhada sugere o grau de imunidade; as linhas perpendiculares marcam a duração de um ciclo exoeritrocítico completo, de 8 dias.

Abaixo do diagrama, a fileira superior, de pontos agrupados em diminuição, sugere o número de merozoítos hepáticos que chegam à circulação depois de sucessivas esquizogonias hepáticas. Esse número decresce com cada ciclo hepático, até cessar a formação de esquizontes no fígado.

A fileira inferior, de pontos agrupados, representa número bem maior de merozoítos hepáticos, liberados cada 8 dias. Somente uma fração destes basta para dar início à parasitemia de uma recaída (ao final do 18° ciclo hepático), desde que a imunidade seja bastante baixa para que a progênie da primeira esquizogonia eritrocítica escape à destruição e invada eficazmente novos glóbulos vermelhos. Deve-se, pois, presumir que os merozoítos vindos diretamente do fígado não são afetados pela imunidade do hospedeiro; contudo, os que são produzidos pela primeira e as subseqüentes esquizogonias eritrocíticas são, indubitavelmente, suscetíveis à imunidade já desenvolvida.

Pode muito bem ser que as recaídas provenham de esquizontes hepáticos latentes ou de crescimento muito lento. O desenvolvimento latente explicaria também os acessos primários retardados do chamado *vivax* do clima temperado.

3. O SANGUE EM RELAÇÃO AO DIAGNÓSTICO DA MALÁRIA

O sangue é o meio em que são encontrados os parasitos da malária. Já que êle é o veículo que traz o parasito ao campo visual do microscopista que o procura, é de grande vantagem conhecer alguma coisa a seu respeito.

O sangue consiste em um líquido chamado plasma, no qual se encontram em suspensão elementos celulares (eritrocitos, leucocitos, plaquetas), que se formam na medula óssea e são postos na circulação periférica.

Os eritrocitos ou glóbulos vermelhos são discos bicôncavos¹ isolados ou em grupos ou empilhados como moedas. A essa disposição dá-se o nome de "rouleaux," isto é, rôlo. Mediante ligeira pressão sobre o fluido sangüíneo, pôsto sob uma lamínula, os eritrocitos podem ser comprimidos e grandemente deformados, sem prejuízo de sua estrutura. São de côr castanha amarelado por causa da hemoglobina, na qual os parasitos, se existirem e forem suficientemente desenvolvidos para conter pigmentos, podem ser reconhecidos. O exame de sangue a fresco não é, portanto, prático. Os glóbulos vermelhos têm, no máximo, 120 dias de vida.

Os eritrocitos derivam, também, de certo tipo de célula da medula óssea, sendo que as fases primárias contêm um núcleo. Pouco antes de serem lançados na circulação, perdem o núcleo e os glóbulos vermelhos jovens, de vários tamanhos, podem conter elementos que se prestam à coloração com azul e que sòmente são vistos com a coloração intensa do esfregaço. Êsses elementos, que são variadamente descritos como retículo (de reticulocitos), policromasia e basofilia punctata, desaparecem todos 1 a 3 dias após a liberação das células no sangue. Nas gôtas espêssas,² pode-se ver, nos espaços claros entre os leucocitos, não só as plaquetas mas também massas azuladas, que variam em tamanho, desde o pequeno linfocito até o grande, polimorfonuclear. Êsses "restos de glóbulos vermelhos jovens, azulados", variam na aparência, desde a fina neblina, tendendo para nuvens escuras, até densos grânulos azuis de vários tamanhos. Seu número varia desde 1-3 por campo, em sangue normal, até um número incontável, nos casos em que a malária ou outra qualquer infecção provoca anemia grave, forçando a medula óssea a soltar na circulação grande número de células imaturas.

Segundo as condições do ambiente, o aspecto das hemácias novas pode alterar-se grandemente. No sôro ou em solução a 0,85% de cloreto de sódio, preserva-se o seu contôrno liso e circular. Se a quantidade de sal é aumentada para 1,5%, as células podem apresentar protuberâncias na superfície externa, assemelhando-se a uma mina submarina de contacto. Tais células são crenadas e podem conservar essa aparência mesmo depois da coloração. O excesso ou insuficiência de sal na solução causa a rutura das células, cuja hemoglobina torna e mantém a água ver-

¹ Ver diagrama, Apêndice 3, pág. 94.

² Ver seção 6, págs. 33-35.

LEUCOCITOS



LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES



EOSINOFILOS



LINFOCITO PEQUENO



MONOCITO



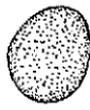
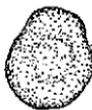
LINFOCITO GRANDE



PLAQUETAS



RESTOS DE CÉLULAS



ERITROCITOS

melha. A exposição das células aos álcoois fortes, ao calor e mesmo à ação do tempo depois do sangue ter sido tirado “fixará” a hemoglobina em suas células e a desmoglobinização não se verificará. Daí a necessidade de corar as gôtas espessas, tão logo quanto possível, em seguida à sua colheita.

Os leucocitos ou glóbulos brancos são transparentes e muito refrativos (refringentes), podendo mostrar movimento de seu citoplasma. Em geral, seus núcleos têm a tonalidade de um azul-violeta carregado. Variam de tamanho e forma e o citoplasma pode ser claro ou granuloso, de acôrdo com o tipo da célula. A vida de um leucocito é curta (3 a 5 dias), de modo que a aparência de alguns tipos de polimorfonucleares varia desde elementos compactos, perfeitamente definidos e bem corados, até grandes células, pálidas, irregulares e, muitas vêzes, deformadas. O diagrama 2 mostra os leucocitos mais comuns.

As plaquetas sanguíneas (Diagrama 2) não têm núcleo. São fragmentos do citoplasma de uma espécie de célula gigante da medula óssea chamada *megacariocito*. Podem apresentar-se isoladas ou em grupos. São de diferentes densidades na mesma lâmina, mas a côr varia do rosa ao violeta (nunca azul) em amostras diferentes. Variam de tamanho e forma; em sangue que tenha sido secado lentamente ou que tenha sido desfibrinado, podem assemelhar-se a qualquer outra coisa encontrada no sangue. Se as lâminas forem coradas depois de decorrido muito tempo, as plaquetas podem adquirir coloração suficientemente forte para impedir que se vejam pequenos parasitos.

Como encontrar parasitos da malária no sangue. Quando não se encontram parasitos da malária no exame microscópico, não se deve, de modo nenhum, aceitar o fato como prova suficiente da sua inexistência no sangue examinado; às vêzes, o número de parasitos é pequeno demais para que sua presença se revele em exames comuns. Por exemplo, em Ghana, numa clínica pré-natal, algumas mulheres foram submetidas a cuidadosas observações, mediante exames regulares de gôta espessa, de 100 campos cada um. Encontraram-se gametos de *P. falciparum* em 7%. Quando se prepararam simultâneamente 10 gôtas espessas e se examinaram 100 campos de cada uma, 20% apresentaram gametocitos. É

interessante observar que 6 exames foram suficientes para encontrar 18% de casos positivos e 4 exames posteriores revelaram somente 2% de casos mais.

O único meio de garantir que uma pessoa não tem parasitos de malária no sangue é inocular 2-400 cc de seu sangue num voluntário. Se não se manifestar parasitemia, o sangue é negativo; caso contrário, a infecção original era submicroscópica quando o sangue foi tirado.

Deve-se ter em conta também que o sangue de um indivíduo normal, sadio e bem nutrido pode ser bastante diferente do sangue de uma pessoa que já teve malária ou qualquer outra doença debilitante durante tempo considerável. As modificações da aparência normal dos parasitos podem ser devidas a alterações no formato dos próprios glóbulos vermelhos, independentemente da espécie da infecção malárica.

A despeito da maneira como aparecem na gôta espessa desemo-globinizada, os parasitos da malária não podem ter existência independente. Exceto nos breves períodos em que se transferem de uma célula para outra, êsses micro-organismos são *intracelulares* nas hemácias.

Deixado em repouso num tubo de ensaio o sangue integral coagula-se, devido à interação das plaquetas e dos elementos do plasma que produzem a fibrina; a massa esponjosa da fibrina, que envolve a maior parte dos glóbulos vermelhos, contrai-se e forma um coágulo, e o *sêro* amarelo-claro, separa-se. A gôta de sangue numa lâmina, a menos que distendida prontamente, coagulará da mesma maneira que no tubo e o plasma se modificará consideravelmente. Isso afeta o modo como a preparação adere à lâmina. Distendendo-se o sangue depois de iniciada a coagulação, produzem-se áreas de diferentes espessuras e distintas concentrações de células, as quais podem ser facilmente reconhecidas sob a objetiva de pequeno aumento. Em lugar de uniformemente distribuídos como nos esfregaços distendidos sem demora, os leucocitos apresentam-se enfileirados ou conglomerados.

A parte líquida do sangue contém tantos anticorpos quantos o organismo possa produzir e constitui o meio líquido que mantém úmidas as células e os parasitos. A falta de umidade destrói a ambos. A parte celular proporciona, nas preparações sangüíneas, vários elementos que não só fornecem dados sobre o paciente como também ajudam a julgar a qualidade da preparação e sua coloração.

Uma gôta de *sangue fresco* entre a lâmina e a lamínula e ilumi-

nada com luz bastante reduzida pelo fechamento do diafragma pode ser examinada tanto com objetiva de pequeno aumento (10x) como com objetiva de maior aumento (43x). Pode-se também usar a objetiva de imersão,¹ se as células não correrem ao ser focado o aparelho.

Aspectos dos elementos do sangue numa gôta espessa bem corada

Leucocitos. Em geral, os núcleos dos leucocitos, de formato variado, são de côr violeta-azulado, enquanto que o citoplasma varia de acôrdo com o tipo da célula. Os *neutrófilos* têm grânulos de diferentes côres e são irregulares no tamanho, formato e distribuição. A coloração de qualidade inferior pode tornar o citoplasma tão vermelho que o microscopista inexperiente costuma confundi-lo com o eosinófilo. Por outro lado, os grânulos citoplasmáticos do eosinófilo são tão grandes e regulares em tamanho, forma e consistência, que podem ser facilmente reconhecidos nas preparações não coradas, nas quais os núcleos não podem ser vistos. Os próprios grânulos compactos são de côr vermelho-cobre, de aparência mais discreta que proeminente, não apresentando aquela côr vermelho brilhante, a rosa, que é a característica dos cortes tissulares corados com a eosina. Se tivéssemos de selecionar um único exemplo, isolado, sugestivo de coloração de má qualidade, bem poderíamos apresentar como tal o aspecto dêsses grânulos.

Os linfocitos e monocitos (ver Diagrama 2, pág. 12) têm apenas uma massa única de material nuclear. Os *pequenos* linfocitos são extremamente importantes para o microscopista, porque servem como base de medida nas gôtas espessas, da mesma forma que o eritrocito no esfregaço. São as células mais uniformes do sangue e medem 8-10 micra. Têm, provavelmente, uma vida de cerca de 100 dias. O citoplasma dos linfocitos é azul pálido, um tanto transparente e às vêzes contém alguns grânulos vermelhos brilhantes.

Os monocitos são, no sentido clínico, as células mais importantes para o paciente e seu número aumenta durante a infecção

¹ Ver Apêndice 17, pág. 110.

malárica. Como fagocitos ativos, são capazes de absorver não só os pigmentos maláricos mas também as células vermelhas que contenham esquizontes adultos. Seu citoplasma apresenta um estroma azul-acinzentado e os núcleos têm uma fenda mais ou menos saliente (Diagrama 2).

4. COMPORTAMENTO GERAL DAS DIFERENTES ESPÉCIES DO PLASMODIUM NO SANGUE PERIFÉRICO

Individualmente, os parasitos variam em tamanho, forma e aspecto, exatamente como qualquer animal multicelular.

Algumas formas de certa espécie, isto é, as pequenas fases do *P. vivax* semelhantes a gametocitos, podem parecer idênticas a fases mais evoluídas do *P. malariae*. Na realidade, a única forma de parasito que pode ser considerada como *única* ou *típica* é o gametocito do *P. falciparum*.

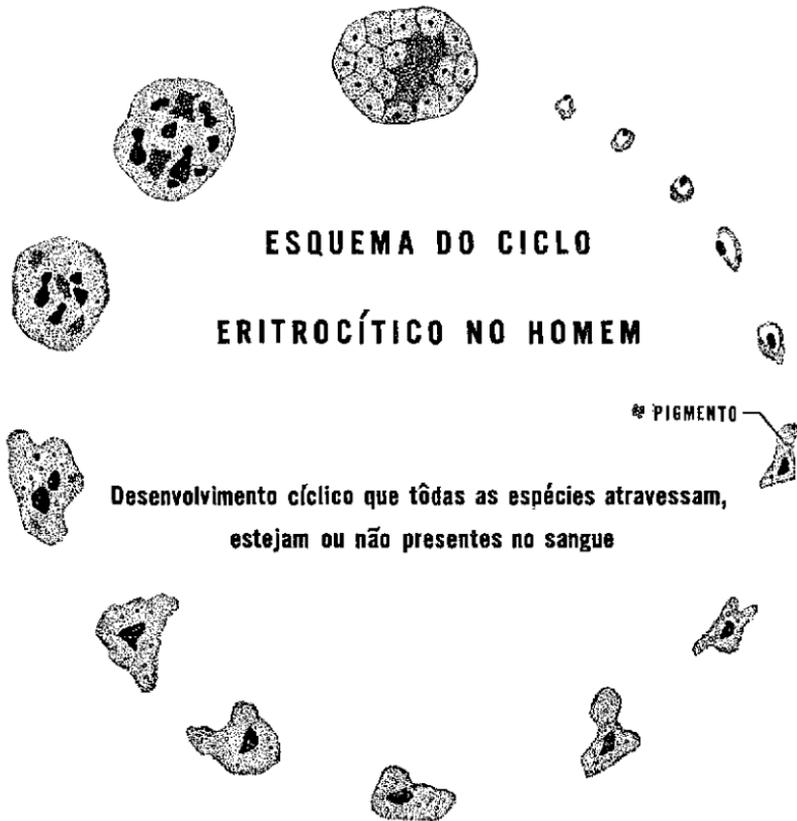
Para identificar com precisão a espécie, basta ter sob o microscópio exemplares distintos de parasitos em número suficiente para mostrar o *tipo de variação* constante em cada espécie. Não basta guardar na memória uma série de formas comumente observadas nos esfregaços das várias espécies, às quais se atribuem características específicas nem sempre corretas. É necessário que o examinador conheça as possíveis variações das formas, não só em cada uma das diferentes espécies mas também nas diferentes condições do sangue.

Cada vez que focalizar nova forma de parasito, o examinador deve fazer a si mesmo duas perguntas: (a) Será isso, realmente, um parasito? (b) Se é, seu aspecto se enquadra no *tipo de variação* esperado para a espécie de que se suspeita? (Diagrama 3).

A resposta para (a) é, em geral, obtida pela procura, nas imediações da nova forma, de um parasito que não deixe margem a dúvidas. Examina-se-lhe a côr e a densidade da cromatina, bem como o aspecto do citoplasma. Se não forem semelhantes aos do elemento recém-encontrado, é improvável que êste seja de fato um organismo.

Uma vez decidido que a nova forma é, realmente, um parasito, cabe fazer mais duas perguntas: (a) Quantos estão presentes?

DIAGRAMA 3



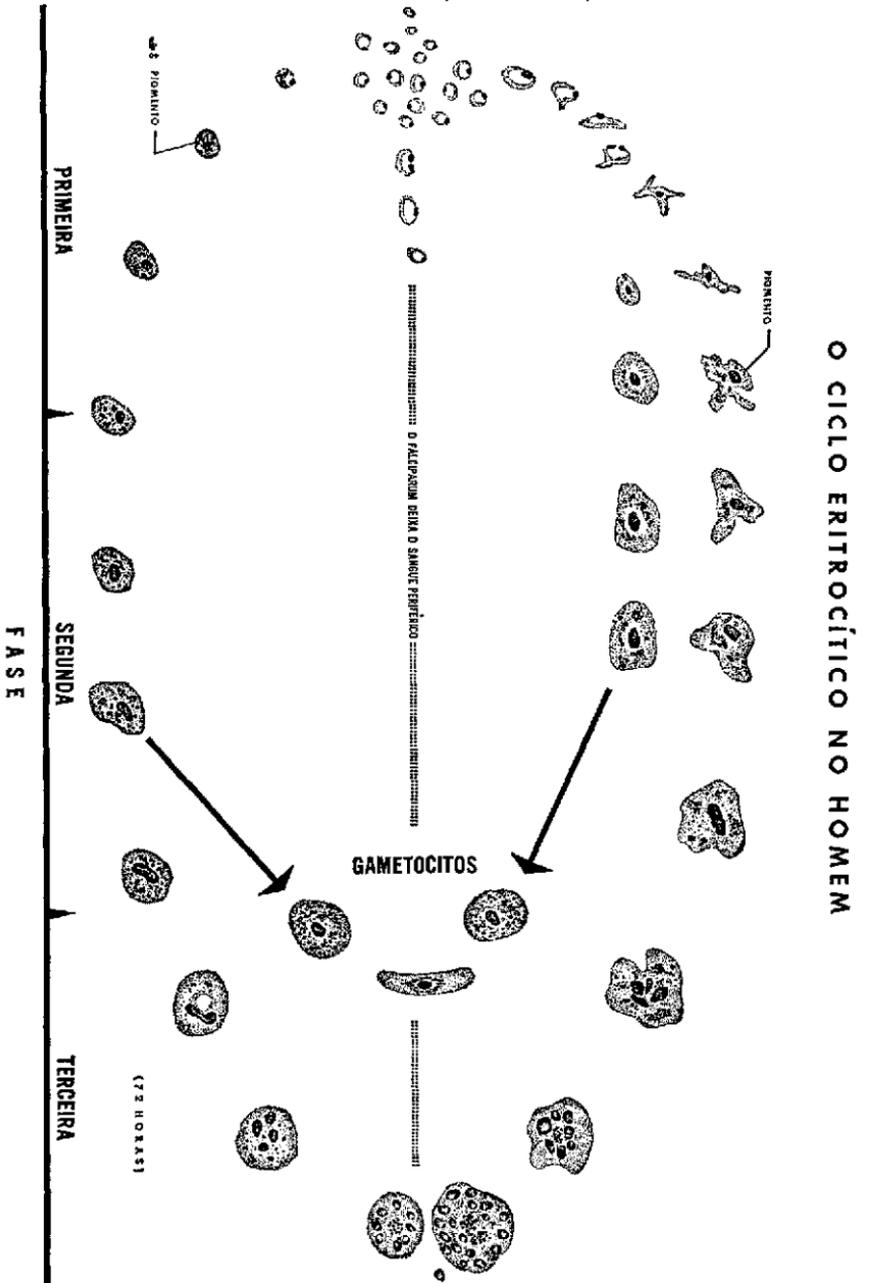
(b) Sua fase de desenvolvimento se enquadra no limite de desenvolvimento que, de acôrdo com a experiência e observação, pode ser encontrada em certo ponto do ciclo da espécie "X", ou essa fase nunca é encontrada no ciclo da espécie "X"?

Como a revisão das lâminas é essencial no diagnóstico de uma espécie, torna-se importante saber, uma vez reconhecidos os parasitos, se são numerosos ou raros. Se forem numerosos, é provável que o diagnóstico da espécie esteja correto; quando há poucos parasitos, pode-se tornar difícil seu diagnóstico. Um sistema de símbolos pode dar uma aproximação do número presente.¹

Antes de fazer o diagnóstico definitivo de um esfregaço positivo, é necessário percorrer pelo menos 50 campos. Se se verificar que nem tôdas as formas pertencem à espécie "X", será necessário

¹ Ver seção 14, Registro e notificação dos resultados, págs. 63-65.

OS MEROZOÍTOS PROVENIENTES DO FÍGADO OU OS ESQUIZONTES ERITROCÍTICOS INVADEM, RÁPIDAMENTE, AS HEMÁCIAS



O CICLO ERITROCÍTICO NO HOMEM

fazer outros exames para confirmar a suspeita de que algumas formas de uma segunda espécie possam também estar presentes.

Gerações. Tôdas as espécies podem ter mais de uma geração de parasitos ao mesmo tempo, como demonstra, esquematicamente, o filme de Shortt, mencionado à página 3. Embora o *falciparum*, o *vivax* e o *ovale* requeiram um período de 48 horas para a maturação de suas formas assexuadas, é bem possível e nada incomum cada uma produzir um paroxismo diário. Esse paroxismo diário indica a existência de duas gerações de uma das espécies citadas ou reflete a presença de três gerações do *malariae*. Uma vez estabelecida a geração predominante, eliminam-se tôdas as outras.

As diferentes gerações originam-se da liberação dos merozoítos do fígado em diversos momentos do acesso primário duma infecção provocada por mosquitos. Podem também aparecer espontaneamente numa infecção contínua que tenha demonstrado, durante algum tempo, a periodicidade regular de uma só geração. Não é necessário que a infecção seja de origem esporozoítica para o desenvolvimento de uma segunda geração. Aparentemente, na esquizogonia de uma infecção de geração única (ao fim de cada período de 48 horas), a maioria das células parasitadas rompe-se dentro da mesma hora e as restantes completam sua divisão em vários intervalos, antes ou depois da maioria. Quando a esquizogonia leva 5 horas em lugar de 1 e a maioria das células rompe-se durante a terceira hora, as várias células não se dividem senão 2 horas mais tarde. As que deram início ao processo esquizogônico fizeram-no duas horas antes da maioria.

Um ciclo mais tarde, o grupo que deu início à esquizogonia encontra-se 4 horas à frente da maioria (os últimos grupos completam o processo 4 horas depois). Após certo número de ciclos, haverá uma quantidade considerável de parasitos que se maturaram 24 horas antes e 24 horas depois da maioria. Juntos, êsses parasitos podem constituir número suficiente para produzir outra esquizogonia 24 horas antes da que será causada pela maioria, isto é, a geração dominante. Assim se desenvolve nova geração independentemente da fase exoeritrocítica.

O Diagrama 4 mostra, de maneira esquemática e condensada, o ciclo eritrocítico das três espécies comuns da malária no homem, tal como se mostra no sangue periférico. Representa as três fases da esquizogonia. Na parte de cima, vêem-se os merozoítos logo

após a rutura dos esquizontes maturados. Esses merozoítos penetram imediatamente nas hemácias (*vivax* à direita). Embora tomando tôda a altura do diagrama, o ciclo é contínuo e a forma menor, que se vê na parte de cima, é encontrada imediatamente após a rutura do esquizonte maior, visto na parte de baixo. O diagnóstico da espécie será grandemente facilitado se um organismo recém-encontrado fôr mentalmente transferido para o lugar que lhe cabe nesse ciclo do diagrama.

5. CARACTERÍSTICAS INDIVIDUAIS DAS ESPÉCIES NO SANGUE PERIFÉRICO

Há diferenças no comportamento individual das espécies responsáveis não só pelos sintomas produzidos no paciente como também pelas formas presentes no sangue.

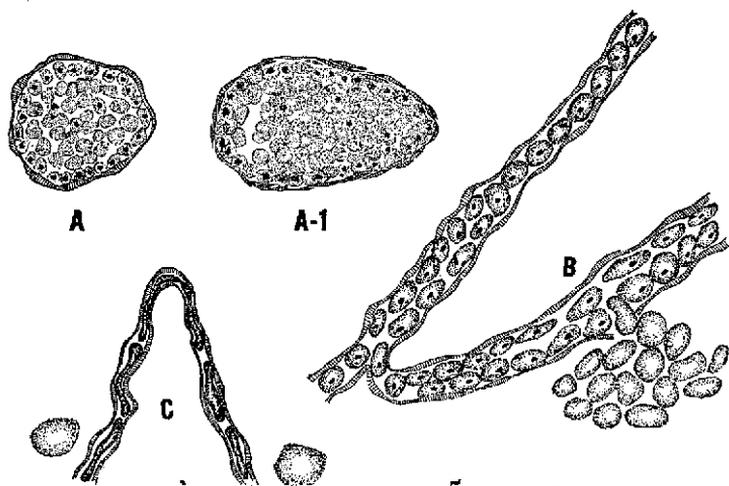
P. falciparum. Aparentemente, quando o merozoíto penetra num glóbulo vermelho, sua simples presença produz no próprio glóbulo certa alteração, a qual se podia descrever como uma viscosidade de sua camada ou membrana externa. Não se trata, certamente, de qualquer propriedade específica da célula, uma vez que os merozoítos do *falciparum* entram indiscriminadamente em glóbulos vermelhos *jovens e velhos*, enquanto os do *vivax* mostram preferência para os glóbulos mais jovens e os do *malariae* têm preferência igualmente definida para os glóbulos velhos.

O Diagrama 5 mostra o aspecto da autópsia de uma infecção fatal pelo *falciparum*. Talvez se devesse explicar primeiramente que nos cortes de tecido não se pode esperar a conhecida aparência dos parasitos e dos glóbulos parasitados, comum nos esfregaços bem corados. Com a costumeira coloração de hematoxilina e eosina, raramente se vêem os parasitos, mas sua presença é indicada por uma quantidade de pigmento proporcional ao tamanho do parasito durante sua vida.

A cromatina e o citoplasma podem ser diferenciados em material corado com o corante de Tomlinson¹ e prontamente colocado no fixador próprio.

¹ Boyd, Mark F., ed.: *Malariology*. Philadelphia and London: W. B. Saunders Company, 1949, pp. 899-900.

DIAGRAMA 5

ASPECTO, À AUTOPSIA, DE UMA INFECÇÃO FATAL POR *P. falciparum*

O exame de qualquer tecido, especialmente do cérebro, demonstrará a freqüência com que são encontrados glóbulos vermelhos parasitados ao longo das paredes dos pequenos vasos sanguíneos, onde são baixas tanto a corrente como a pressão sanguínea. Nos vasos menores, onde há pouca ou nenhuma turbulência, êsses glóbulos vermelhos, ligeiramente aderidos, não se desalojam. Assim, uma vênula pode apresentar-se totalmente forrada de glóbulos vermelhos parasitados, conquanto poucas ou nenhuma hemácia das que se amontoam na luz do vaso contenha parasito (seção A do Diagrama 5). Embora o corte (A) do diagrama tenha sido desenhado pela primeira vez em 1946 para ajudar a explicar o fenômeno da viscosidade, 8 cortes seriados de cérebro de um caso fatal de malária *falciparum* ocorrido em Costa Rica em 1959 demonstraram o corte transversal de uma pequena vênula praticamente idêntica a (A), tal como se vê na reprodução microfotográfica (A-1).

De maneira mais definida, os capilares quase sempre revelam que cada glóbulo vermelho tem uma mancha de pigmento, o que representa tudo quanto resta do que foi em vida um parasito. Pode-se compreender o que ocorreu quando se encontram hemorragias petequiais de um capilar rôto. Nenhum dos glóbulos vermelhos da hemorragia conterá parasito, pois nesses espaços confinados os glóbulos parasitados estão aderidos ao revestimento

endotelial (seção B). Mercê de sua bem conhecida capacidade de se acomodarem a uma variedade de constrictões e obstruções, as células *não parasitadas* podem, desde que exista alguma pressão, insinuar-se por entre as células fixas (seção C) e sair pela abertura resultante do grave dano sofrido por algumas células de revestimento. Enquanto o endotélio permanece intacto, não se verificam hemorragias.

A morte não é provocada por qualquer substância tóxica que os parasitos produzam, mas por sua interferência na função normal do endotélio vascular. É óbvio que a morte ocorre quando o número de células parasitadas se torna tão grande que os tecidos cuja existência depende dêsse suprimento vascular ficam privados do abastecimento essencial de oxigênio, eletrólitos, etc., especialmente quando o fenômeno afeta centros vitais. É pouco provável que a morte se verifique na ocasião da esquizogonia, senão logo depois que um número máximo de células recém-parasitadas se retiram do sangue circulante e se instalam na superfície do endotélio vascular. É possível que a notável melhora que se observa, com frequência, nas infecções cerebrais graves coincidam com uma esquizogonia que livra temporariamente, o endotélio das células que o obstruem. O número cada vez maior das células infectadas que resultam dessa esquizogonia ocupa tanta quantidade de endotélio que o organismo não suporta. Portanto, a morte ocorre provavelmente, 15 a 24 horas depois da esquizogonia final.

É muito provável que na patologia a diferença entre um caso fatal de *falciparum* e um caso grave que se restabeleça seja apenas questão de grau. As infecções graves de *falciparum*, com elevada parasitemia, são cada vez mais difíceis de encontrar; mas se ocorrer uma em centro provido de instalações adequadas, será o caso de tentar biópsias hepáticas por meio de agulhas, com o objetivo de demonstrar o quadro patológico durante a vida.

Pelo que foi descrito, é fácil compreender porque somente as formas jovens de parasitos em crescimento são encontradas no sangue periférico. Só é possível observar os fenômenos embólicos quando há choque. A falta de tono muscular das paredes dos vasos libera, evidentemente, as células mal aderidas.

Supõem-se que o crescimento e desenvolvimento dos gametocitos de *falciparum* tenha lugar em glóbulos vermelhos que aderem da mesma maneira ao revestimento do endotélio; e que, maturando-se e alongando-se os gametocitos, ditos glóbulos se lancem na circulação.

DIAGRAMA 6

P. falciparum

A elevada parasitemia típica desses casos é possível porque os vasos sanguíneos, cujo revestimento está coberto de células parasitadas, encontram-se repletos também de células não infectadas. Os esquizontes estacionários que se rompem liberam merozoítos, que se comprimem contra centenas de células. Um ou mais merozoítos entram rapidamente no glóbulo vermelho mais próximo, seja este jovem, velho ou de meia idade.

No acesso primário de malária *falciparum*, a parasitemia aparece por volta do 10° ao 12° dia, seguida, 24 horas depois, pelo aparecimento dos sintomas. Os gametocitos só se apresentam 8 a 10 dias mais tarde, quando o organismo está apto a produzi-los. Sem tratamento, as formas anulares e os gametocitos podem persistir juntos por vários dias ou semanas, até que o paciente adquira imunidade bastante para eliminar as formas assexuadas. Desaparecidas estas, cessa a produção de gametocitos, mas os que já estão presentes podem continuar circulando durante 2 a 4 semanas. (Ver Apêndice 2, Comportamento dos gametocitos de *P. falciparum*, pág. 93.)

Para descrever com precisão os achados no sangue das três fases da infecção *falciparum*, bastam os seguintes símbolos: F somente para anéis; F + g para anéis e gametocitos; e Fg somente para gametocitos.¹

O estudante que começa a aprender a diagnosticar as espécies deve recorrer a pelo menos uma dúzia de amostras de sangues diferentes que contenham F e F + g. Cada parasito deve ser cuidadosamente estudado, até que o estudante tenha visto o maior número possível de anéis de *falciparum*. Deve ser capaz de reconhecer o grau de variação que encontre e procurar saber até que tamanho, no máximo, o parasito *falciparum* em crescimento pode ser visto no sangue periférico.

Assim, quando encontre, em qualquer ocasião, formas maiores que as observadas no *falciparum*, estará êle em condições de julgar da possibilidade, mais provável, de se tratar de infecção *vivax* ou *malariae*. O estudante deverá conhecer também os menores anéis que podem ser encontrados. Os anéis de *falciparum* são descritos como pequenos, médios e grandes. Quanto mais próxima da última esquizogonia a coleta de sangue, maior a proporção dos anéis pequenos. Se a proporção de anéis grandes fôr a maior, pode-se esperar que o número total de parasitos diminuirá acentuadamente dentro de 6 horas. Deve também ficar claro que quando a infecção envolve uma geração apenas, os parasitos podem ausentar-se do sangue por várias horas, como indica o Diagrama 4 (ver pág. 18). Por outro lado, as infecções de uma geração apenas são raras nas populações semi-ímmunes.

É possível, naturalmente, ocorrer mais uma geração de *falciparum* ao mesmo tempo, do que resulta os parasitos nunca desaparecerem do sangue periférico, embora seu número possa variar consideravelmente.

P. vivax. A palavra *vivax* significa vivaz e descreve com precisão a atividade quase frenética que a espécie apresenta. O merozoíto *vivax* mostra clara preferência para os glóbulos vermelhos mais jovens, mais elásticos que os maduros e, por conseguinte, mais capazes de se dilatar para acomodar melhor o parasito em crescimento. Como não há, porém, viscosidade nas células vermelhas hospedeiras, feito no caso do *falciparum*, os glóbulos vermelhos

¹ Ver seção 14, Registro e notificação dos resultados, pág. 63.

DIAGRAMA 7

P. vivax

parasitados circulam livremente durante todo o ciclo ou série de ciclos eritrocíticos, enquanto a esquizogonia se processa na circulação. O tempo que os merozoítos liberados levam procurando nova célula hospedeira é bem maior que no caso do *falciparum*. Ainda assim, não excede, provavelmente, 5 minutos e o número de parasitos perdidos pela fagocitose é bem maior. As parasitemias totais nunca são tão elevadas como no *falciparum*. Os merozoítos de *vivax*, em sua pressa de encontrar outro abrigo, podem, às vezes, atacar nova célula, até nela penetrar um, dois, três ou mais. Quando a célula se divide, não é raro encontrar-se mais de uma partícula de cromatina nos novos parasitos, a segunda das quais é, muitas vezes, menor que a primeira. Apesar das aparências, esses parasitos relativamente jovens não se acham ainda em processo de segmentação. Os parasitos *vivax* recém-introduzidos nos glóbulos vermelhos movem-se por toda a célula, produzindo pseudópodos citoplasmáticos que alcançam todas as partes da mesma. Surgem, em consequência, formas de estranha aparência, tão numerosas e tão variáveis que é inútil pensar em desenhar mais que algumas

delas. Assim, torna-se às vezes impossível reconhecer com segurança, na gôta espessa, um parasito grande e irregular. Os pequenos filamentos do citoplasma que ligam os fragmentos são, muitas vezes, delgados demais para serem vistos (Diagrama 8). Uma parte do parasito é freqüentemente compacta e pode conter todo o pigmento do resto do citoplasma, de modo que as pequenas massas adjacentes do citoplasma passam despercebidas. Na verdade, para identificar todo o contorno do parasito numa gôta espessa, muitas vezes é necessário incluir tudo que se encontra numa área igual à ocupada pelo maior leucocito polimorfonuclear visto no mesmo sangue. A confusão que freqüentemente se faz no diagnóstico do *vivax* e *malariae* deve-se ao fato de se considerarem essas partes grandes e densas como o parasito inteiro.

A membrana do glóbulo vermelho, em vez de se tornar viscosa, passa por alterações que, após a coloração do esfregaço, produzem no envoltório da célula grânulos avermelhados de tamanho, forma e distribuição regulares. Esses grânulos, a princípio minúsculos, logo se agrandam e se tornam mais proeminentes. São conhecidos

DIAGRAMA 8

ASPECTO DO *P. vivax* EM GÔTA ESPÉSSA, A INTERVALOS DE 12 HORAS

como granulação de Schüffner.¹ Na gôta espessa, principalmente na periferia, esse fenômeno de coloração assume a forma de um halo rosado que envolve os parasitos e ocupa todo o glóbulo vermelho hospedeiro. Essa coloração de Schüffner ocorre somente nas infecções *vivax* e *ovale*. Deve-se tirar vantagem apenas de sua presença, não de sua ausência, uma vez que é necessária certa perfeição na coloração para que o fenômeno se produza. Somente 10% das lâminas coradas rotineiramente mostram esse halo.

À medida que vai crescendo, o parasito *vivax* torna-se um tanto arredondado e regular e o pré-esquizonte adulto, completamente desenvolvido, assemelha-se tanto ao gametocito que é difícil distinguir um do outro. Uma vez estabelecida a parasitemia, os gametocitos aparecem rapidamente. Ao contrário dos do *falciparum*, os gametocitos do *vivax* não aparecem na circulação inteiramente desenvolvidos, senão crescem no sangue periférico. Esses gametocitos em crescimento, de citoplasma denso e compacto e, com frequência, bastante pigmentados, são às vezes confundidos com parasitos *malariae* em crescimento, na primeira metade do ciclo.

Ao contrário dos do *falciparum*, esses gametocitos não continuam circulando muito depois de submetidos à ação de medicamento esquizonticida. São tão suscetíveis a esses medicamentos quanto os próprios esquizontes. Não há razão para se confundirem os gametocitos de *vivax* com os gametocitos de *malariae*, em vista da escassez destes últimos.

Numa gôta de sangue apenas, pode-se encontrar desde um quarto até dois terços do ciclo. O número de merozoítos nos esquizontes maduros pouco antes da rutura varia, em geral, de 14 a 24. Quando existem duas gerações podem estar presentes tôdas as fases do parasito.

Como tôdas as fases do parasito se acham, geralmente, na gôta de sangue examinada, é desnecessário especificar que as formas encontradas eram trofozoítos, esquizontes e gametocitos.

Um simples V (V = *vivax*) indicará que tôdas as formas podem estar presentes. Embora se alegue, às vezes, que só as formas anulares de *vivax* podem ser encontradas, raras vezes é esse o caso, pois um exame cuidadoso revelará numerosas fases pequenas e irregulares, que nunca se observam no *falciparum*. Mediante pesquisa cuidadosa, é bem provável que se encontrem também formas adiantadas de segmentação.

¹ Ver Apêndice 6, O fenômeno da coloração de Schüffner, pág. 98.

Deve-se ressaltar que o *falciparum* domina o *vivax* e o *vivax* domina o *malariae*, mas é pouco comum encontrar-se qualquer outra associação além da de gametocitos *vivax* e *falciparum*. As chamadas infecções mistas não existem clinicamente, senão durante 24 a 48 horas, enquanto as duas espécies presentes se combatem. Repetimos: O *falciparum* domina sempre o *vivax* e o *vivax* domina sempre o *malariae*, isto é, $F > V > M$. No sentido clínico, pelo menos, as infecções mistas quase nunca ocorrem.

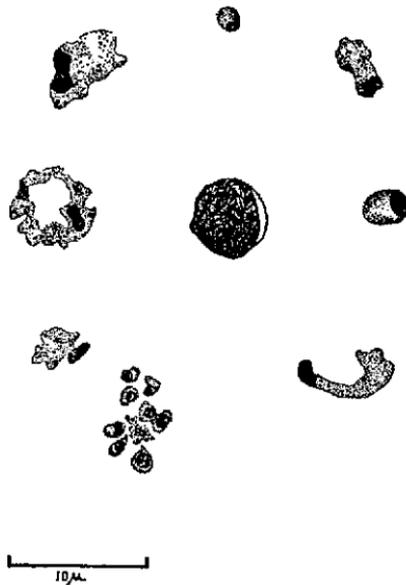
Uma indicação numérica aproximada daria idéia mais exata. As espécies subordinadas podem ser indicadas colocando-se o seu símbolo entre parênteses; por exemplo: ++++F (17M),¹ o que significa que existem mais de 20 anéis de *falciparum* por campo e 17 parasitos de *malariae* por 100 campos.

P. malariae. A infecção quartã produzida pelo *P. malariae* está, em geral, presente nas regiões onde se encontram as outras duas espécies; e, via de regra, a elas se subordina. Chamam-lhe, porisso, às vêzes, espécie de estação sêca. Como os gametocitos são, geralmente, escassos, a transmissão por mosquitos no laboratório é rara. A fase pré-eritrocítica dura 11 dias e os parasitos podem aparecer no sangue entre o 19° e 30° dias. A persistência das infecções do *malariae* é bem conhecida. Acredita-se que certo caso durou 52 anos. Como as drogas esquizonticidas modernas são bastante eficientes, é pouco provável que se encontrem no futuro infecções de tão longa duração.

As infecções por *P. malariae* diferem das infecções causadas pelas outras duas espécies mais importantes por provocarem efeitos secundários que nas mesmas nunca se verificam: determinados distúrbios renais e perda de hemoglobina, além da que provém da rutura das células parasitadas. Em contraste com os do *vivax*, os merozoítos do *malariae* preferem os glóbulos vermelhos mais velhos. Essa preferência e sua média de esquizogonia de 8 a 12 divisões resultam numa parasitemia total mais baixa que no caso do *vivax*. O aumento de 50% no tempo de desenvolvimento e a atividade nitidamente mais baixa, em comparação com o *vivax* dão como resultado produção precoce e maior de pigmento. Uma vez na célula, o parasito da quartã permanece imóvel, alimentando-se por osmose. Não emite pseudópodos. As formas adiantadas de pré-segmentação e segmentação mostram, às vêzes,

¹ Ver seção 14, págs. 63-65.

DIAGRAMA 9

P. malariae

considerável irregularidade, por haver o parasito penetrado num glóbulo vermelho em forma de pneumático.¹ Todo o parasito fica alojado na parte tubular periférica dos discos bicôncavos dos glóbulos vermelhos, a qual contém quantidade de hemoglobina menor que a normal. Formas semelhantes são encontradas nas infecções *vivax* que persistirem tempo suficiente para causar a diminuição dos valores hematócritos e hemoglobínicos. Numa só gota de sangue de quartã vê-se uma parte do ciclo menor que numa só gota de *vivax*. Quando tôdas as fases do ciclo do *malariae* estão presentes na mesma amostra de sangue, é sinal de que ali se encontram três gerações (Diagrama 9).

Pouco depois de terminada a fase anular até chegar a dos esquizontes maduros, a característica geral dos parasitos do *P. malariae* é a densidade, a pigmentação acentuada e a uniformidade e regu-

¹ Ver Apêndice 3, pág. 94.

laridade de sua forma. Existe também um tipo de pontilhado que somente se encontra com o uso de uma técnica perfeita, raras vezes alcançada nas preparações rotineiras.

Não é raro encontrar-se de 1 a 4% de parasitos característicos de quartã persistentes numa infecção que em outras circunstâncias poderia ser, claramente, *falciparum* ou *vivax*. Erro comum, que resulta em diagnóstico incorreto do *malariae*, é o que ocorre quando sangue contendo apenas gametocitos de *falciparum* seca tão lentamente que dá tempo para que os parasitos tomem a forma arredondada. Quando suficientemente numerosas, essas formas podem ser confundidas com parasitos de quartã.

As verdadeiras infecções mistas não ocorrem, porém, com frequência que justifique reservar-lhes uma coluna exclusiva no boletim de notificação. A instituição de tal coluna implica frequência que não existe, sugere importância que de fato não há e favorece diagnósticos apressados e coloração menos cuidadosa. Espera-se que as notificações e seus registros sejam antes o reflexo exato das infecções na população em lugar de um pomposo informe sobre achados parasitológicos, de valor mais acadêmico que prático.

PARTE II

Preparação das lâminas de sangue

6. PREPARAÇÃO DA GÔTA ESPÉSSA

As lâminas limpas são empacotadas em lotes de 5, 10 ou 15. O pacote de 5 é provavelmente o mais apropriado para o trabalho no campo (ver seção 16, Lâminas para microscopia, pág. 67). Rasga-se e remove-se uma das pontas do invólucro, expondo-se assim uma das extremidades das lâminas (Diagrama 10, fig. 1); tiram-se 2 lâminas e colocam-se as mesmas sôbre o pacote. Procura-se uma área plana, limpa e clara para trabalhar. Se não houver mesa, banco ou cadeira, pode-se utilizar um pedaço de papelão resistente, que se deverá ter sempre à mão para êsse fim. Se o piso ou banco não fôr plano, uma das pessoas presentes pode segurar o papelão. É bom colocar uma fôlha de papel branco sob a lâmina quando se estender o sangue. Os principiantes devem estar munidos de um guia ou modelo¹ que mostre a posição das gôtas espêssas, únicas ou múltiplas, na lâmina.

O sangue é tirado do lóbulo da orelha, se êste fôr suficientemente carnudo, do dedo indicador da mão esquerda, ou do dedo grande do pé, se se tratar de criança. A punção é feita não no centro da polpa do dedo, mas num dos lados, com um estilete aguçado, especial para êsse fim e que pode ser utilizado várias vêzes. Dêste último, o mais comumente usado é a metade de uma pena de escrever de qualquer tipo apropriado. Os estiletos de mola raramente são bastante aguçados e machucam mais do que é necessário. Para o trabalho diário e contínuo, merece consideração o estilete de Bard-Parker No. 11. Introduce-se a parte cega do estilete na superfície inferior de uma pequena rôlha, que fica servindo de cabo. Quando o estilete não está em uso, o melhor é guardá-lo espetado na superfície externa da rôlha do vidro de álcool, que deve ser de bôca mais ou menos larga e ter 30 cc de capacidade. Deixado permanentemente no álcool, o estilete oxida-se demais. Para mantê-lo limpo e aguçado, pode-se empregar uma lixa fina (No. 00 ou 000) antes do trabalho diário ou quando necessário (ver Diagrama 10, figs. 2, 3 e 4).

Para se ter sempre à mão tal lixa, coloca-se por fora do vidro de álcool, prêso por elástico ou barbante e com a superfície áspera voltada para dentro, um pedaço de 4 × 6 cm da mesma (fig. 3).

¹ Ver Apêndice 5, págs. 97-98.

Dentro do vidro, coloca-se álcool a 95%. Quando houver necessidade de limpar o estilete, coloca-se a lixa sôbre um pacote de lâminas ou qualquer outra superfície firme e plana e esfrega-se o estilete contra a lixa até remover todos os traços de sangue sêco ou ferrugem. O gume e a ponta devem ficar tão afiados que não seja possível vê-los com facilidade, sem o auxílio de uma lupa (fig. 4).

A pele, no lugar da picada, deve ser limpa com algodão ou gaze umedecidos em álcool para remover o grosso da sujeira e suor sêco, mas logo em seguida deve-se *secar o local com algodão ou gaze sêcos* (fig. 7). O algodão de fibra longa é o mais aconselhável que os de tipos inferiores, que têm muito mais fibrilas. É mais satisfatória a gaze ou atadura cortadas em pequenos pedaços. O estilete ou pena é molhado em álcool, enxuto (fig. 6) e espetado leve e rapidamente na pele; as primeiras gôtas de sangue devem ser desprezadas e removidas com gaze sêca. Ao efetuar a punção, o operador deve segurar firmemente, com a mão esquerda, o dedo do paciente. Após a picada, aperta gentilmente a ponta do dedo picado até o sangue sair e formar uma gôta esférica sôbre a pele sêca (figs. 8, 9 e 10).

O operador apoia firmemente o bordo de uma lâmina limpa contra o seu próprio indicador (fig. 11) e inclina-a lentamente até que sua superfície toque a parte superior da gôta. A quantidade de sangue extraída determinará se é necessário tirar outra gôta de sangue; se fôr, a segunda gôta será colocada ao lado da primeira. Coloca-se a lâmina, sem perda de tempo, numa superfície plana, lisa e, de preferência, branca; e espalha-se o sangue (fig. 12) com o canto de uma segunda lâmina, da qual se utiliza sômente cinco milímetros de seu bordo até que se obtenha uma película quadrada ou retangular de espessura adequada.

Quando é necessário tomar mais de uma gôta do mesmo paciente, enxuga-se bem o local de onde se extraiu a primeira, e a segunda pode ser colhida e espalhada com o canto de uma lâmina limpa, diretamente na superfície de outra lâmina. Para evitar a transferência de sangue de uma gôta para outra, é necessário limpar imediatamente o bordo da lâmina usada para espalhar o sangue.

Com o sangue restante no local da punção faz-se uma camada mais delgada, isto é, um esfregaço parcial, para no mesmo se escrever, depois de sêco, com lápis comum No. 1 ou com um lápis de marcar filme,¹ a respectiva identificação (figs. 13 e 14).

¹ Ver Apêndice 13, Lápis para marcar no sangue, pág. 105.

PREPARAÇÃO DE GÔTA ESPÉSSA

INSTRUÇÕES



Figura 1 Para abrir o pacote de lâminas novas, rasga-se e remove-se uma das extremidades do invólucro. As lâminas devem ser sempre tomadas pelos bordos ou extremidades, entre o polegar e o indicador, de modo a não se tocar na sua superfície.

Figura 2 Qualquer lanceta de ponta aguçada e limpa pode ser usada como estilete. A extremidade rombuda do estilete deve ser introduzida numa rôlha pequena, pelo lado mais estreito desta. Quando o instrumento não está em uso, deve ser espetado na parte superior da rôlha do vidro de álcool, de 30 cc de capacidade e boca moderadamente larga. Deixado permanentemente no álcool, o estilete oxida-se demais.

Figura 3 Com um elástico, prende-se um pedaço de lixa no vidro de álcool, em cuja rôlha se encontra o estilete. Essa lixa serve para limpar e afiar o estilete, quando necessário.

Figura 4 Para aguçar o estilete, segure-se firmemente a lixa sobre um pacote de lâminas ou outra superfície sólida e plana.

Figura 5 Preencham-se tôdas as informações exigidas no boletim de "Notificação de Caso Febril", tendo-se o cuidado de indicar o número de pôsto do colaborador e o número de série da lâmina.

Figura 6 Limpe-se o estilete com um chumaço de gaze ou algodão absorvente umedecido em álcool. Coloque-se a rôlha que contém o estilete limpo sobre a mesa, de lado, de tal modo que a ponta do estilete fique livre de qualquer contacto.

Figura 7 Antes de picar o dedo, limpe-se a pele da área escolhida, utilizando-se para isso um chumaço de gaze ou algodão absorvente embebido em álcool e depois espremido ligeiramente, para remover o excesso de álcool.

Figura 8 Pique-se o dedo, com um movimento rápido do estilete, no ponto marcado com "X".

Figura 9 A primeira gôta de sangue deve ser cuidadosamente removida com um pedaço de gaze ou algodão seco.

Figura 10 Expremendo-se o dedo, provoca-se a saída de outra gôta de sangue.

Figura 11 Tome-se cuidadosamente por uma das extremidades, uma lâmina limpa e apoie-se o bordo da mesma, com firmeza, no dedo indicador da mão com que se segura o dedo picado e incline-se lentamente a lâmina, até que sua metade superior entre em contacto com a parte de cima da gôta de sangue e retenha uma porção da gôta. Deve-se ter o cuidado de evitar que a lâmina entre em contacto com a pele. Se ainda permanecer no dedo sangue suficiente, coloque-se uma segunda gôta na lâmina, 5 milímetros abaixo da primeira, preparando-se assim a operação vista na figura 13.

Figura 12 Coloque-se a lâmina, com a face para cima, sobre uma fôlha de papel e, usando-se 5 mm do canto inferior de uma segunda lâmina, espalhe-se o sangue de modo a formar-se uma película quadrada ou retangular. Limpe-se imediatamente o sangue da lâmina utilizada para espalhar o sangue.

Figura 13 Com o mesmo canto da referida lâmina, colha-se um pouco do sangue que permanece no dedo.

Figura 14 Espalhe-se esse sangue, ou seja, a segunda gôta mencionada na figura 11, para fazer na mesma as anotações.

Figura 15 Limpe-se o dedo do doador com um chumaço de algodão ou gaze saturado com álcool. Se o sangue continuar a sair, mantenha-se um pedaço de algodão seco sobre o ponto picado até cessar a hemorragia.

Figura 16 Para secar os esfregaços de sangue, abane-se a lâmina com um pedaço de papelão, até o sangue perder o brilho.

Figura 17 Empregando-se um lápis No. 1 ou Dixon No. 2225, lápis "Film Mark", escreva-se na segunda gôta o número de pôsto do colaborador, o número de série da lâmina e a data em que a mesma foi preparada.

Figura 18 Quando se tiver que colher grande número de gôtas na mesma ocasião, podem-se colocar transversalmente, numa mesma lâmina, 5 gôtas espessas e estreitas. A gôta tirada em primeiro lugar deve ser distendida até o bordo da lâmina, para identificação. O número do doador da primeira gôta servirá para identificar tôdas as demais na lâmina, sendo que aquêlê número é colocado ao lado direito da primeira gôta ou, melhor ainda, sendo possível, escrito com um lápis de ponta de diamante, no canto inferior direito da lâmina. Esses números terminarão sempre em 1 ou 6.

Figura 19 Uma ou duas lâminas podem ser embrulhadas na mesma fôlha de informação, contanto que as gôtas que contém sejam tiradas da mesma pessoa. Podem-se colocar, também, 3 ou 4 lâminas juntas, firmemente embrulhadas no papel próprio. As fôlhas de identificação devem envolver o pacote.

Hoje, não se preparam gôtas espessas tão espessas como antigamente, nem se usa mais mexê-las ou desfibriná-las. A densidade adequada de uma gôta espessa é a espessura máxima que a vista atravessa, sob a objetiva de imersão, depois de colorido o material. Pode-se avaliar essa espessura fazendo-se primeiramente uma gôta demasiado espessa, insuficientemente distendida. Inclina-se a lâmina, de modo a colocá-la em posição perpendicular; forma-se imediatamente uma gôta que escorre para o bordo inferior da lâmina. Em outra lâmina distende-se mais a mesma quantidade de sangue e torna-se a colocá-la em posição vertical. Se a gôta se forma rapidamente, cumpre distender a próxima gôta ainda mais, até que o sangue recém-espalhado não escorra senão muito lentamente.

A gôta espessa, depois de pronta, deve ocupar a metade interna dos dois terços distais da lâmina, deixando-se de cada lado da mesma 1,5 cm de espaço livre, para facilitar a manipulação enquanto a lâmina estiver molhada.

O lugar onde se escreve a identificação pode ser coberto com o sangue que permanece um pouco mais tempo na superfície da pele. Se o serviço de malária não tem chave ou símbolos especiais para identificar o doador, escrevam-se claramente, com um lápis macio, suas iniciais e a data, marcando-se o mês com algarismo romano; exemplo: P M B 17 XII 3, o que quer dizer "17 de dezembro de 1963." Sòmente as lâminas feitas para coleções-padrão necessitam do número da década.

Nos lugares muito úmidos, pode-se apressar a secagem da lâmina abanando-se rapidamente um pedaço de papelão sôbre a mesma (fig. 16). O Humigraph¹ é barato e útil para mostrar as alterações de umidade que tanto afetam a secagem das lâminas.

Caso seja necessário, podem-se colocar na mesma lâmina, transversalmente, 5 gôtas espessas estreitas e identificá-las por meio de símbolos ou números escritos com um lápis de grafite No. 1 no bordo inferior da primeira gôta ou com lápis de ponta de diamante no canto direito inferior da lâmina. A primeira gôta colhida pode ser distendida até o bordo da lâmina, para se diferenciar das demais.

¹ A. Daigger and Co., 159 West Kinzie Street, Chicago 10, Illinois (ver Apêndice 14, pág. 106).

7. TEORIA DA COLORAÇÃO DO SANGUE

A coloração do sangue foi sempre complicada pela grande variação própria do azul de metileno. Praticamente todos os corantes de sangue derivam do azul de metileno preparado de um modo ou de outro. Sabendo-se que é possível obter resultados bastante variáveis ainda quando se empregam, da mesma maneira, os mesmos lotes de azul de metileno, é fácil compreender que variação idêntica pode ocorrer com os corantes Giemsa, Wright ou Leishman. Em certos casos, a diferença pode ser tão grande que alguns lotes de corante ficam inutilizados.

Em 1925, foi criada nos Estados Unidos a Comissão de Corantes Biológicos para experimentar todo lote de corante e eliminar os que não sejam satisfatórios. Porisso, antes de comprar corantes de sangue nos Estados Unidos, é aconselhável verificar se o produto traz o número do certificado da Comissão de Corantes, o que assegura sua qualidade satisfatória, pelo menos na ocasião em que foi experimentado pela mesma.

Com respeito ao corante Giemsa, que é da máxima utilidade nas atividades de malária, alguns laboratoristas ainda preparam seus corantes com os componentes originalmente usados, obtendo, muitas vezes, resultados surpreendentemente bons. Contudo, salvo circunstâncias excepcionais, aconselha-se ao principiante não tentar êsse método, pois nem sempre será bem sucedido. Embora existam no comércio muitos corantes Giemsa bons e alguns mesmo excelentes, não é possível recomendar nenhum deles com segurança. O procedimento mais seguro seria obter pequenas amostras (1 a 5 gramas) de pelo menos três fontes diferentes e submetê-las, extensa e repetidamente, às técnicas e condições da localidade. Sômente assim se deverá adquirir uma grande quantidade.

O que acima se diz pode explicar a confiança quase absoluta de alguns pesquisadores antigos em certas marcas e tipos de corantes. Pode também explicar porque certos corantes Giemsa são satisfatórios quando dissolvidos em uma marca de álcool metílico e menos satisfatórios quando dissolvidos em outras. Os elementos dissolvidos encontram-se, evidentemente, em equilíbrio químico tão delicado que as mais leves alterações de reação podem produzir resultados surpreendentes.

O componente básico de um corante de sangue consiste em certo tipo de eosinato de azul de metileno dissolvido ou em álcool

metílico puro ou em uma proporção igual por pêsos desse álcool e glicerina pura. O álcool metílico é, em geral, livre de acetona, embora nem todos os álcoois livres de acetona dêem resultados satisfatórios. Essa solução alcoólica de corante de Giemsa é a única forma conveniente com que pode ser preparada a solução aquosa que em verdade faz a coloração simultânea de vermelho, azul e violeta dos elementos do sangue. É pouco provável que os elementos dissolvidos permaneçam na solução mais de 45 a 90 minutos, pois a partir desse momento começam a precipitar e separam-se da solução. Isso é importante por dois motivos: (1) tôdas as soluções de Giemsa devem ser preparadas imediatamente antes do uso; e (2) se a água contamina a solução alcoólica mãe, porções valiosas dos elementos corantes precipitam-se dessa solução mãe na proporção da quantidade da água presente. Os resultados da introdução repetida de uma pipeta úmida no vidro da solução mãe podem ser desastrosos. A contaminação aquosa do corante alcoólico padrão ocorre mais freqüente e sutilmente pela capacidade que o álcool puro tem de absorver umidade. Isso pode ocorrer com bastante rapidez nos trópicos, onde a umidade é alta. Esse fato deu origem à velha e geral crença de que os corantes de sangue se deterioram nos trópicos. Portanto, convém apertar de vez em quando as tampas rosqueadas dos vidros e trocar as rôlhas de cortiça quando estas perdem a elasticidade. As tampas de vidro esmerilhado devem ser limpas tôdas as vêzes que forem colocadas no vidro, pois o acúmulo de corante sêco nas mesmas pode impedir sua perfeita adaptação.

Para evitar a ocorrência dessa deterioração imperceptível e contínua do corante Giemsa, é aconselhável usar pequenos frascos com capacidade suficiente apenas para um ou dois dias de trabalho. Quando não houver vidros conta-gôtas de matéria plástica, pode-se usar o velho tubo de ensaio amarrado ao vidro de corante, mas o arranjo não deixa de ser um tanto impróprio. Os pequenos frascos plásticos com conta-gôtas e hermêticamente fechados com tampa de rôsca, como os que se usam para perfumes e certos medicamentos, são ideais para trabalhar com o corante Giemsa.¹ Portanto, os frascos que contenham a solução mãe só serão abertos quando necessário para encher de nôvo os frascos de uso diário.

As mesmas precauções descritas para o corante Giemsa devem ser tomadas para todos os outros corantes do tipo Romanowsky,

¹ Ver Apêndice 12, Frascos conta-gôtas plásticos, pág. 105.

tais como o Wright e o Leishman, ainda que ordinariamente não se use glicerina. *Esses corantes são dissolvidos em álcool metílico puro na proporção de 0,15-0,18 gm por 100 cc de álcool metílico*, enquanto que o Giemsa é feito como segue:

Corante Giemsa em pó (certificado)	0,75 gm
Álcool metílico puro	65,0 cc
Glicerina pura	35,0 cc

Na falta de Giemsa, pode-se, às vêzes, obter excelentes resultados usando-se os pós de Wright e Leishman *na mesma proporção do Giemsa* e, naturalmente, empregando-se as mesmas técnicas.

Para preparar os corantes, recomenda-se, há muito, misturá-los num gral. A trituração prolongada com glicerina ou álcool metílico, ou com ambos, é ainda processo de rotina. Nos climas secos, isso pode ser, provavelmente, feito sem risco, mas com esse método a exposição é demasiado prolongada. Além disso, porções úmidas de pó de corante invariavelmente aderem às paredes do gral e à mão do mesmo. Em lugar desse método, o procedimento que tem sido usado por anos com sucesso é colocar o pó seco diretamente num frasco de tamanho conveniente, contendo a quantidade adequada da mistura álcool-glicerina. Colocam-se também no frasco no mínimo 50 pérolas de vidro escrupulosamente limpas, de vários tamanhos, mas até 5 mm de diâmetro, no máximo. Esse frasco é agitado muito bem, a intervalos determinados, 6 a 10 vêzes por dia, durante um mínimo de 3 dias. Retiram-se então, diàriamente, pequenas amostras, para filtrá-las em papel de filtro de espessura média e experimentá-las em gôtas espessas de sangue recentes. Quando todos os elementos do sangue são vistos em suas côres próprias, filtra-se a quantidade suficiente de corante em um ou dois frascos de uso diário, ficando assim o corante pronto para uso. O restante do corante é guardado sem filtrar até que se neces-site dêle. Por causa da possível variação dos ingredientes individuais, o frasco que contém a solução mãe deve ter um rótulo grande com o nome, número do lote, a quantidade de cada um deles e a data da preparação.

Vale ressaltar de novo, por ser importante, que *todos os frascos ou receptáculos de corante líquido devem permanecer hermeticamente fechados*. Se as instruções acima citadas forem meticolosamente seguidas, verificar-se-á que, em vez de se deteriorarem, esses corantes melhoram com o tempo, estejam nos trópicos ou em outro lugar qualquer.

Diluentes. Como sòmente as soluções aquosas de corantes de sangue recém-preparadas dão às preparações as côres bem conhecidas, o diluente usado tem muita importância. Para os corantes de sangue, utilizam-se os seguintes diluentes: água de poços nascentes, rios, córregos ou de torneira; água destilada, de chuva, bidestilada e tridestilada; e finalmente as duas mais usadas: a água tamponada e a água neutralizada. Quando faltar temporariamente a água destilada, podem-se adicionar os sais para a confecção da água tamponada à água da torneira. Essa combinação não deve nunca substituir o uso da água destilada. A água de chuva, captada num recipiente esmaltado limpo ou em outra vasilha de superfície lisa colocada a meio metro acima do solo, é água destilada.

Deve-se notar que não é possível pré-determinar a reação adequada para todos os corantes. *A prova final da adaptabilidade ou reação do diluente consiste no aspecto do sangue visto ao microscópio.* Portanto, deve-se usar uma combinação qualquer que proporcione de modo constante bons resultados, por mais heterodoxa que pareça. Em certas áreas, onde a água passa através de florestas e prados, terrenos arenosos, argilosos ou rochosos, a da torneira pode ser muito satisfatória. Por outro lado, costuma ser completamente inadequada quando passa através de rochas calcáreas. A água que contém bactérias aerógenas, fermentos ou algas pode ser inadequada, a não ser depois de fervida durante 5 minutos e filtrada ou posta em sedimentação para restaurar a sua cristalinidade. Devem-se desprezar tôdas as águas que não sejam cristalinas.

Quando se começou a adicionar sais neutralizantes à água diluente, notou-se logo notável melhora na qualidade das preparações de sangue coradas. De modo geral, a reação dos diluentes que apresentaram êsses resultados melhores estava próxima do ponto de neutralidade (pH 7,0). A experiência tem demonstrado que não existe um pH padrão para todos os tipos de corante e que se deve procurar a reação mais adequada para a coloração desejada. Na prática, a média varia entre pH 6,6 e 7,4, o que coincide com a variação do indicador vermelho fenol.

O fosfato de sódio (Na_2HPO_4) e o fosfato de potássio (KH_2PO_4) são os sais neutralizantes de uso geral. Como o fosfato de sódio cristalino contém 12 moléculas de água de cristalização, êsse produto, exposto ao ar, logo se cobre de pó branco, tornando-se impossível a determinação do seu pêsso exato. Misturado com outros cristais, torna-se uma massa úmida. Portanto, é indispensável especificar que o fosfato monohidrógeno de sódio seja

anidro; o fosfato diidrógeno monopotássico pode assim misturar-se com o sal de sódio anidro em qualquer proporção e ainda permanecer sêco. Na prática, podem-se preparar rapidamente soluções compensadoras adicionando-se a cada litro de água destilada uma grama de uma mistura de sais de potássio e sódio na proporção de 5×6 ou em qualquer outra proporção que tenha dado resultado satisfatório. Misturam-se perfeitamente as quantidades corretas desses sais por meio de trituração num gral, pesa-se o pó homogeneizado em lotes de uma grama (ou mais) e coloca-se o mesmo em pequenos frascos bem fechados. No caso de uso imediato, os sais podem ser embrulhados em papel impermeável ou dissolvidos em pequenas quantidades de água.

Para a coloração adequada de esfregaços de sangue, a água destilada devidamente neutralizada para êsse fim pode ser superior às águas tamponadas. A preparação se faz neutralizando-se a água destilada a um indicador vermelho de fenol com um álcali fraco, tal como o carbonato de lítio a 0,2 por cento. Depois de agitada repetidamente (mínimo de 50 vezes), até que a côr desejada permaneça pelo menos durante 20 minutos, poderá ela ser usada com os corantes Giemsa e Leishman. Essa água neutralizada é usada não só para diluir o corante alcoólico mas também para a lavagem final das lâminas. Os tampões agem como uma espécie de material químico elástico para inativar (dentro de limitada proporção) variadas quantidades de ácido e álcali. A neutralização, por outro lado, é uma reação química fixa que não permite variações.

8. TÉCNICAS DE COLORAÇÃO CONSIDERAÇÕES GERAIS

O esfregaço é preparado distendendo-se uma pequena gôta de sangue fresco com o auxílio do bordo perfeito, liso e igual de uma lâmina nova; sua espessura ideal é a de uma camada de glóbulos. Em contraste, a gôta espessa pode conter 6 a 20 vezes mais sangue, espalhado numa área mais ou menos retangular, de 1,5 por 1,2 cm.

No esfregaço, uma camada única de células estende-se horizontalmente sobre a superfície do vidro; na gôta espessa, há muitas camadas de células, na sua costumeira formação em "rouleaux" e o eixo de uma célula individual pode estar em qualquer direção.

A coloração da camada plana de células no esfregaço tem por fim mostrar o máximo de detalhes das células sanguíneas e de seu conteúdo. Essas preparações são, portanto, "fixadas" pela aplicação de álcool metílico puro, com o fim de reter a hemoglobina nas células e permitir a coloração. É relativamente fácil ver através de uma única camada de glóbulos vermelhos.

Se os glóbulos vermelhos na gôta espessa fôsem assim "fixados," seria quase impossível ver qualquer coisa, a não ser talvez nos bordos da preparação. Assim, pois, é necessário remover a hemoglobina do glóbulo vermelho por um dos vários métodos, separadamente ou durante o processo de coloração. Antigamente, usavam-se soluções fracas de ácido hidrocloreto, água destilada, ou várias outras misturas para remover a hemoglobina, antes de se adicionar o corante. Isto produzia, com frequência, não só a rutura completa dos glóbulos vermelhos mas também a lise e a deformação dos parasitos, leucocitos e outros elementos do sangue. Posteriormente, estabeleceu-se o método de efetuar a desemoglobinização na solução corante.

O primeiro passo na coloração de esfregaços consiste na fixação, o que é diametralmente oposto aos princípios da coloração da gôta espessa.

Tanto o tempo como o calor tendem a "fixar" a hemoglobina nos glóbulos vermelhos, quer em esfregaços quer em gôtas espessas. Portanto, é evidente que quanto mais depressa fôr corada a gôta espessa tanto mais completa será a sua desemoglobinização. Quanto mais tempo forem deixadas sem corar, tanto mais opacas serão as preparações. Em clima quente e úmido, são suficientes 7 a 10 dias para que uma gôta espessa de sangue resulte inadequada para o exame, após a coloração. O esfregaço, porém, pode ter uma aparência bastante boa.

Para mostrar o que aconteceria se as gôtas espessas fôsem "fixadas," basta pingar álcool metílico puro na metade inferior de uma gôta espessa em posição perpendicular e depois submetê-la à técnica comum de coloração para gôtas espessas.

Gotas espessas. A coloração original da gôta espessa consistia em cobrir com azul de metileno diluído uma gôta espessa bastante grande. Como praticamente não havia visibilidade na parte central, pensou-se que se o sangue fôsse bem mexido o exame seria mais fácil. Seguiu-se longo período em que se considerou imprescindível

a desfibrinação, embora com um pouco menos de sangue na gôta se pudesse conseguir o resultado desejado. Desde essa época, o corante *Giemsa* tem sido praticamente o único usado e tornou-se hábito a diluição de 1 gôta para 1 cc de água destilada. As lâminas de gôtas espessas eram postas sôbre bastões de vidro e o corante *Giemsa* diluído era colocado sôbre elas, deixando-se o mesmo durante uma hora, após o que estavam prontas para o exame. Quantidades maiores de lâminas eram coradas apoiadas verticalmente sôbre os bordos ou sôbre as extremidades, em cubas de coloração retangulares ou verticais.

Em 1929, Barber e Komp colocaram a gôta espessa numa extremidade das lâminas e as separaram por meio de um pedaço de papelão bastante grosso, de 2,5 cm quadrado, colocado no outro extremo. Esse processo permitia corar simultâneamente lotes de 25 e mesmo 50 lâminas, colocadas verticalmente numa cuba de coloração. Foi assim que surgiu a prática de colocar a gôta espessa na extremidade da lâmina. Se no lote houvesse uma só lâmina com infecção *falciparum* bem intensa, os parasitos poderiam ser transferidos ocasionalmente às lâminas adjacentes. A lavagem cuidadosa ou o emprêgo de um detergente pode evitar isso.

Em seguida à descoberta de Pampana, da ação desmoglobinizante das soluções isotônicas de azul de metileno, Field desenvolveu seu método de coloração rápida para gôta espessa, tão extensivamente usado na Segunda Guerra Mundial. Esse método consiste na imersão, por 1 a 3 segundos, em solução A (uma mistura de azul de metileno e fosfatos), seguida de breve lavagem em água destilada e de imersão em solução B (uma mistura de eosina e fosfatos). A rapidez do método não permite a completa desmoglobinização, mas mostra tanto os leucocitos como os parasitos com coloração clara e brilhante. Uma modificação dessa coloração foi desenvolvida mais tarde na Índia e é conhecida como coloração J.S.B.

Entre 1920 e 1930, uma firma de Londres fabricou uma placa para coloração, ligeiramente recurvada, de tal maneira que, colocando-se emborcada, na sua curvatura, uma lâmina, ficava por baixo da mesma um espaço que não excedia de 3 mm de profundidade, no qual se punha o corante. Em virtude do pêso molecular da hemoglobina, a posição invertida da gôta espessa facilitava sua desmoglobinização total. A imersão durante um segundo no azul de metileno fosfatado preservava, em grande parte, os elementos celulares do sangue, sem interferir na desmoglobinização. Quando

o Giemsa diluído era colocado sob a lâmina invertida na placa recurvada ou no dorso de uma cuba esmaltada retangular, como se vê no Diagrama 12-E (pág. 46), verificava-se que êsse tratamento permitia excelente coloração após a exposição de apenas 6 a 10 minutos à solução de Giemsa.

Na coloração combinada de gôta espessa e esfregaço, é preciso "fixar" separadamente o esfregaço com álcool metílico, antes de corar a lâmina com uma das técnicas antes mencionadas.

Os esfregaços de sangue, quando isolados, podem ser corados com Giemsa depois de fixados, ou com os corantes May-Grünwald, Wright ou Leishman, com os quais se obtém a fixação aplicando-se antes o corante sem diluir e depois o diluente.¹

9. TRATAMENTO PRÉVIO DAS GÔTAS ESPÊSSAS

Tôda vez que as gôtas espessas demoram a chegar às mãos de pessoa capaz de usar adequadamente o corante Giemsa, é necessário "tratá-las" previamente. Primeiro, mergulham-se as lâminas durante um segundo em solução de azul de metileno fosfatado ou simplesmente derrama-se essa solução sobre o sangue (Diagrama 11, fig. 4). Segundo, deve-se prolongar a lavagem em água tamponada por mais tempo do que na técnica completa de coloração, mas somente até que a margem da gôta espessa se torne azul-acinzentado. Não tente lavar até que a côr vermelha desapareça de tôdo da gôta. Terceiro, escorrem-se as lâminas e deixam-se as mesmas secar em calor brando ou ao sol, para evitar o crescimento de fungos. Quarto, as lâminas são enroladas em pacotes de 15 ou menos e do lado externo deve-se escrever a identificação do conteúdo usando-se lápis macio. Deve-se escrever sempre nos bordos do pacote e não nas superfícies planas das lâminas. Quinto, as lâminas devem ser guardadas em lugar sêco até que possam ser finalmente coradas com solução de Giemsa recém-preparada. Uma vez que não é possível outra desemoglobinização, não há necessidade de virá-las de bôrco. É suficiente deixá-las 5 a 10 minutos na solução de Giemsa. Determinar com a experiência o tempo mínimo necessário.

¹ Ver Apêndice 9, Coloração do esfregaço de sangue, págs. 100-102.

O Diagrama 11 mostra como tratar um pequeno lote de lâminas em casa do colaborador. Quando o número de lâminas é grande, são necessárias apenas as medidas A e B do Diagrama 12. Mover as lâminas delicadamente de um lado para outro na segunda água tamponada até restar apenas um traço de côr avermelhada.

As lâminas mal coradas podem ser coradas de nôvo de vários modos, às vêzes com considerável sucesso. Contudo, não se inventou ainda técnica que dê sempre resultados satisfatórios.

Existem, agora, no mercado frascos conta-gôtas plásticos de 30 a 150 cc de capacidade (ver Apêndice 12, pág. 105). Em tais frascos, o Giemsa fica bem mais protegido contra a umidade do que em qualquer outro recipiente que requeira uma pipeta separada para retirar o número de gôtas necessárias. Portanto, *pode-se equipar o pessoal de avaliação para corar as lâminas no campo* e os colaboradores necessitam fazer apenas o tratamento prévio das lâminas. Tudo quanto se requer para equipar o pessoal de avaliação, além do que já foi recomendado, é um pequeno suprimento adicional de água tamponada e uma superfície limpa e com uma depressão, como se vê no Diagrama 12-E. Tôdas as lâminas tomadas pelo pessoal de avaliação podem ser coradas no campo, depois de acumuladas em quantidade conveniente, todos os dias ou em dias alternados. Essa medida proporcionará aos microscopistas *as melhores preparações possíveis para o exame*.

Comentário. A quantidade de pó corante necessária é apenas uma média e esta pode variar de acôrdo com os resultados desejados. Por exemplo, se um Giemsa dá bons resultados quando dissolvido em certa proporção de glicerina e álcool, essas quantidades devem ser usadas. Quando a solução alcoólica é muito forte e os leucocitos ficam corados em demasia, poderão ser suficiente 5 ou 6 gôtas em 10 cc do diluente. Contudo, é melhor diluir o corante com mais álcool-glicerina, a fim de manter a proporção universal, de uma gôta da solução alcoólica para 1 cc de água tamponada.

Semelhantemente, com relação às soluções tamponadas, devem ser feitas tentativas para achar a proporção ideal de sais que proporcione ótimos resultados. Prepara-se uma série de soluções com diferentes quantidades de fosfato de sódio e fosfato de potássio, nas seguintes proporções: 2:5, 4:5, 6:5, 8:5 e 10:5. Cora-se certo número de preparações do mesmo sangue com o mesmo Giemsa, usando-se a solução tamponada feita com 1 gr de cada uma dessas

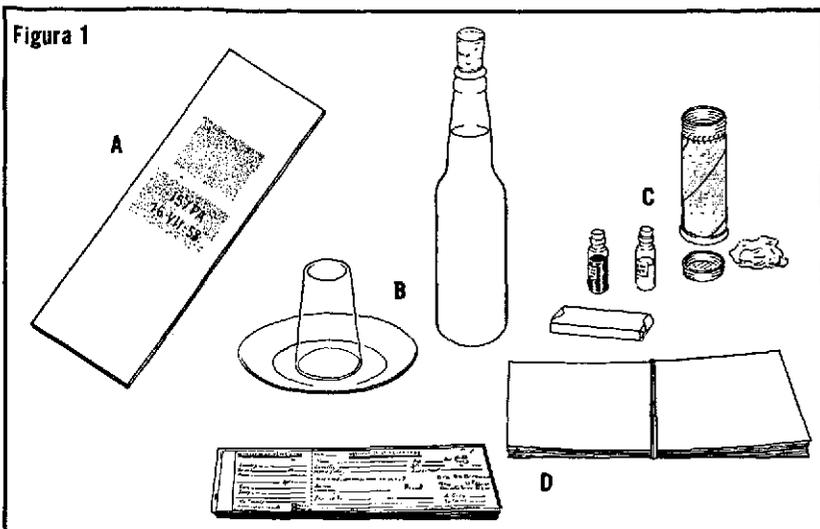


Figura 1

TRATAMENTO PRÉVIO DA GÔTA ESPÉSSA PELOS COLABORADORES VOLUNTÁRIOS

Figura 1

- A. Aspecto da gota espessa antes do tratamento prévio.
- B. Equipamento simples usado pelos colaboradores para tratar previamente as gotas espessas com a solução fosfatada de azul de metileno. Consiste numa garrafa bem limpa contendo 300 cc de água destilada ou água de chuva, um pequeno copo e um pequeno pires.
- C. Tubo cilíndrico de papelão para remessa postal que, ao ser enviado ao colaborador, leva pequenos frascos de solução fosfatada de azul de metileno, sais tampões e um pacote de 3 lâminas.
- D. Bloco de folhas de notificação e um maço de papel para enrolar lâminas.

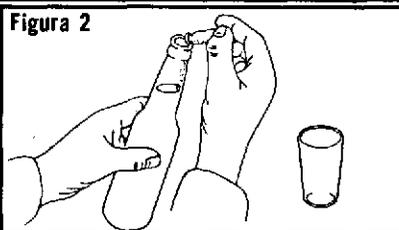


Figura 2

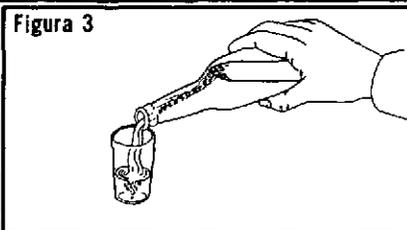


Figura 3

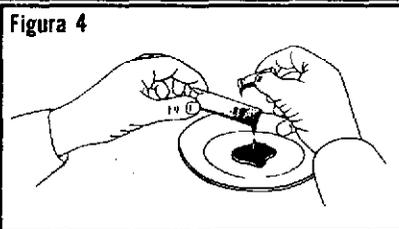


Figura 4

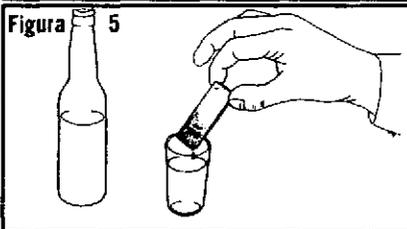


Figura 5

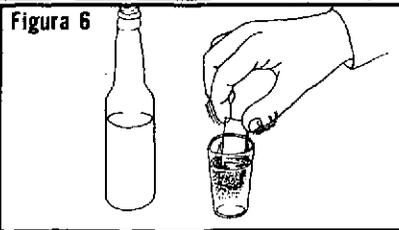


Figura 6

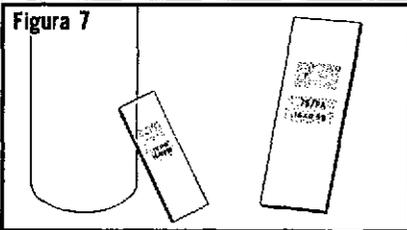


Figura 7

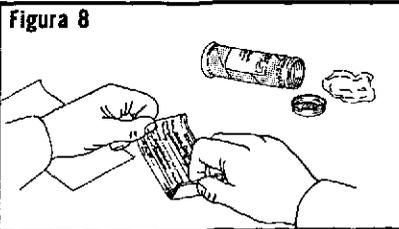


Figura 8

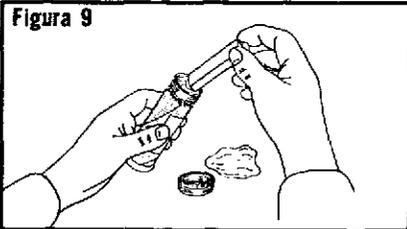


Figura 9

Figura 2

Coloque os sais neutralizantes (pó branco) na garrafa de água.

Figura 3

Dissolvidos os sais, encha o copo com essa solução, até três quartos da altura do copo. A solução tamponada pode ser usada até se tornar turva.

Figura 4

Segure a lâmina formando um ângulo de 20 graus sobre o pires e derrame, em seguida, rapidamente, sobre a lâmina, solução fosfatada de azul de metileno (solução azul) bastante para cobrir o sangue. Um segundo é o suficiente para a ação da solução azul.

Figura 5

Mergulhe imediatamente a lâmina na solução tamponada que se encontra no copo.

Figura 6

Mova a lâmina delicadamente de um lado para outro na solução tamponada, somente até a margem da gota espessa perder a sua cor vermelha. Toda vez que a solução se tornar acentuadamente azul, substitua-a por solução fresca, da garrafa.

Figura 7

Para secar, coloque a lâmina inclinada contra qualquer objeto adequado. A figura mostra a lâmina tal como se apresenta após o tratamento (bem transparente).

Figura 8

Embrulhe a lâmina em seu boletim de notificação.

Figura 9

Coloque as lâminas embrulhadas no tubo cilíndrico de remessa postal, para serem remetidas ao laboratório, usando enchimento, se necessário.

proporções para um litro de água destilada. Usam-se as proporções que derem os melhores resultados. A proporção de 6:5 será, provavelmente, a preferida.

10. TÉCNICA DE COLORAÇÃO DETALHES

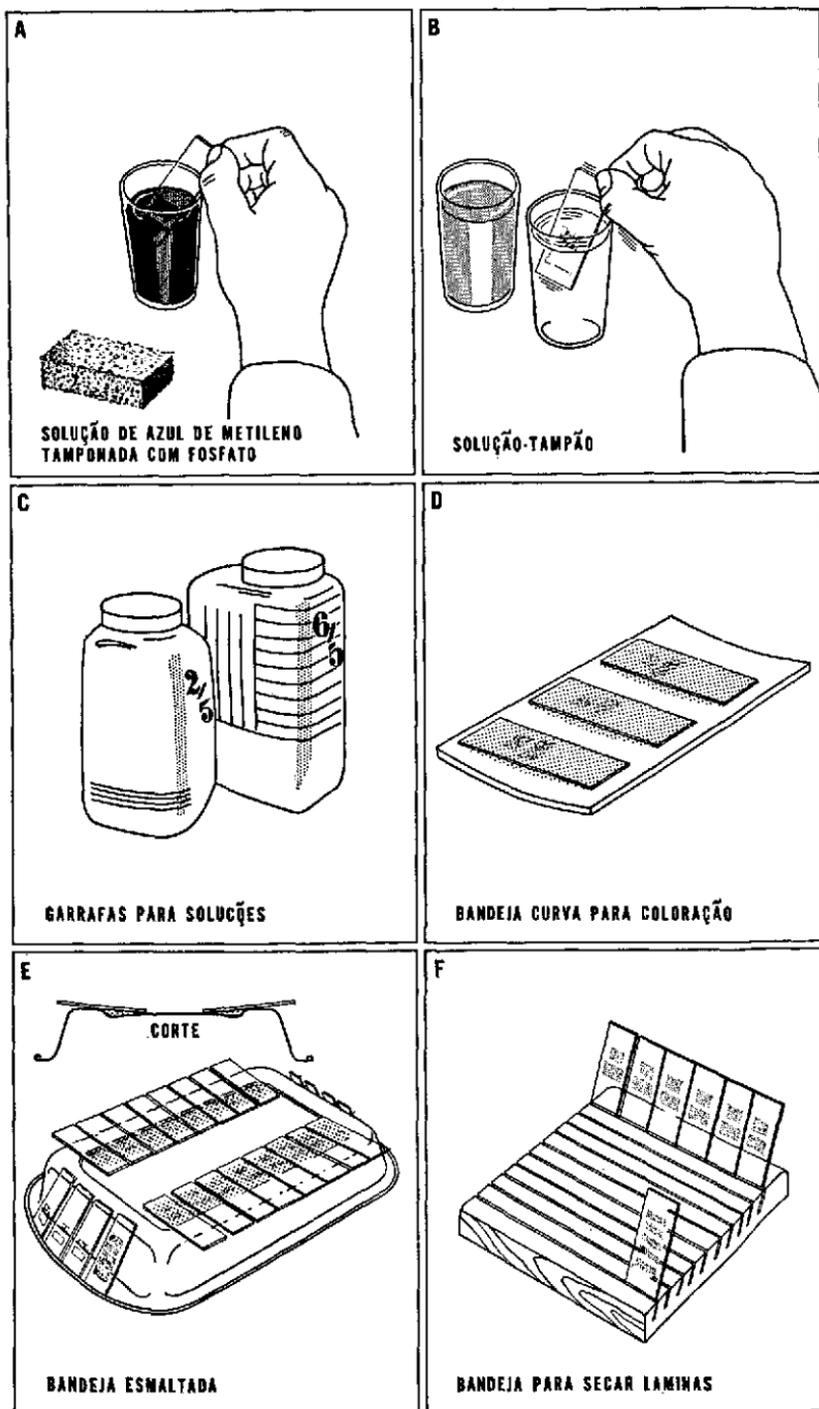
As gotas espessas eram, muitas vezes, coradas unicamente com as soluções de Giemsa. As lâminas eram colocadas com a face voltada para cima, sobre bastões de vidro distanciados 5 cm um do outro e cuidadosamente nivelados; deitava-se sobre as lâminas solução fresca de Giemsa na proporção de 1 gota para 1 cc de água destilada ou tamponada e deixava-se a mesma agir durante 30-60 minutos. Depois de lavadas com o mesmo diluente, as lâminas eram secas ao calor.

Usavam-se cubas de Coplin e cubas retangulares para a coloração das lâminas com Giemsa e os blocos de lâminas acima mencionados eram também corados da mesma maneira.

O tempo de coloração pode variar com cada lote de corante e deve-se experimentá-lo cuidadosamente. A desemoglobinização não é tão completa com o método de Field (pág. 48) como com a técnica de azul de metileno-Giemsa, mas as cores nos bordos da gota espessa são aproximadamente as mesmas com os dois métodos.

Coloração das gotas espessas de sangue (Walker) (Diagrama 12)

1. Verifique cuidadosamente a identificação da amostra e veja se está correta. Use lápis macio de grafite No. 1 para quaisquer anotações ou correções. Não use lápis gorduroso.
2. Mergulhe a lâmina por um segundo—não mais (conte mentalmente “um, mil e um”) na solução fosfatada de azul de metileno. Para diminuir o número de trocas da água tamponada, após a imersão na solução fosfatada de azul de metileno, deve-se tocar ligeiramente a extremidade inferior da lâmina numa esponja plástica, bem molhada e espremida, a fim de tirar rapidamente o excesso de azul.
3. Mergulhe a lâmina 5 vezes na solução tamponada (1 gr da



mistura de fosfatos na proporção de 6:5 por litro de água destilada), a mesma que se usa para diluir o Giemsa. Use 2 vidros de boca larga para mais de 10 lâminas e troque a solução quando esta se tornar acentuadamente azul. (Os sais para a confecção de água tamponada podem ser adicionados à água da torneira quando houver falta momentânea da água destilada.)

4. Coloque as lâminas de bórco sobre uma placa de coloração recurvada e com depressão, de modo que fique sob as mesmas um vão de 2-3 mm; ou então sobre uma cuba esmaltada.
5. Coloque a solução recém-preparada de Giemsa (1 gota para 1 cc de água tamponada) sob as lâminas até que a depressão fique cheia. Retire as bôlhas que se formarem na gota espessa.
6. Deixe o corante agir durante 6-10 minutos.
7. Mergulhe ligeiramente a lâmina na solução tamponada para remover o excesso de Giemsa.
8. Escorra a lâmina e seque-a ao calor.
9. Examine-a com objetiva de imersão.

Preparação de várias soluções para o diagnóstico da malária

1. *Azul de metileno fosfatado*

Azul de metileno medicinal	1,0 gm
Fosfato de sódio monoidrógeno, anidro (Na_2HPO_4)	3,0 gm
Ortofosfato monopotássico (KH_2PO_4)	1,0 gm

Esses ingredientes devem ser muito bem misturados num gral seco e depois colocados em frascos bem tapados, em lotes de 1 grama cada um. O conteúdo de um frasco é dissolvido em 250-350 cc de água destilada e filtrado, se necessário.

2. *Corante de Giemsa, certificado, líquido, ou*

Corante de Giemsa em pó, certificado	0,75 gm
Álcool metílico puro	65,0 cc
Glicerina pura	35,0 cc

Agitar bem numa garrafa com pérolas de vidro, 6-10 vezes por dia, até ficar bem misturado. Manter sempre a garrafa bem tapada. Se não se tiver à mão o pó de Giemsa, pode-se usar o pó de Wright, na mesma proporção. Não há necessidade de

aquecimento; utilizá-lo por volta do terceiro dia ou logo depois que os testes diários com sangue normal indiquem sua qualidade satisfatória. Filtrar somente se fôr necessário, ao reencher a garrafa plástica.

3. *Água tamponada*

Fosfato de sódio monoidrôgeno, anidro (Na_2HPO_4)	6,0 gm
Ortofosfato monopotássico (KH_2PO_4)	5,0 gm

Misturar muito bem num gral, 1 gm da mistura para 1,000 cc de água destilada.

4. *O corante de Field consiste em duas soluções aquosas:*

Solução A:

Azul de metileno	0,8 gm
Azur 1 = azur A	0,5 gm

dissolver em 500 cc da solução tamponada 4:5

Solução B:

Eosina, amarela s.a.	1,0 gm
----------------------	--------

dissolver em 500 cc da solução tamponada 4:5

Para corar, mergulhe a lâmina por um segundo (1-3 seg.) na solução A; lave-a suavemente em seguida em água destilada ou tamponada; mergulhe-a por dois segundos (1-4 seg.) na solução B; depois, lave-a suavemente, deixe-a escorrer e seque-a.

5. *Corante de Wright, certificado, líquido, ou*

Corante de Wright em pó, certificado	0,15-0,18 gm
Álcool metílico puro	100 ml

Agitar bem numa garrafa com pérolas de vidro e conservar num frasco pequeno, bem tapado. Filtrar se necessário.

PARTE III

O exame microscópico

11. MICROSCÓPIOS

Três tipos de microscópios são empregados nos programas de erradicação da malária:

1. O microscópio composto (monocular ou binocular);
2. O microscópio estereoscópico;
3. A lente de mão ou lupa, com aumento de 2x a 10x.

A lupa, antes considerada instrumento de entomologia, é extremamente útil para examinar várias partes do microscópio composto, tais como parafusos espanados, cremalheiras e engrenagens danificadas; ou para procurar partículas de óleo endurecidas e impurezas nas superfícies lisas ou de vidro. O microscópio estereoscópico, instrumento corrente em qualquer campanha de malária, deve também ser usado quando se desejar aumento maior. É indispensável ainda uma lupa de 5x para examinar objetivas através das quais não se esteja vendo com clareza.

Os microscópios compostos são dotados de corpos monoculares ou binoculares. Alguns fabricantes também equipam este último com um tubo monocular.

O Diagrama 13 mostra que o corpo monocular consiste num único tubo (canhão). Desde há muito é de hábito, por questão de conforto, inclinar o microscópio monocular em sua base para permitir a inclinação da ocular de modo semelhante ao dos microscópios binoculares. No caso de se dispor somente de microscópios monoculares, é aconselhável dotar o aparelho com tubo monocular inclinado. Se o aumento deste fôr de 1,5x, deve-se usar ocular de aumento

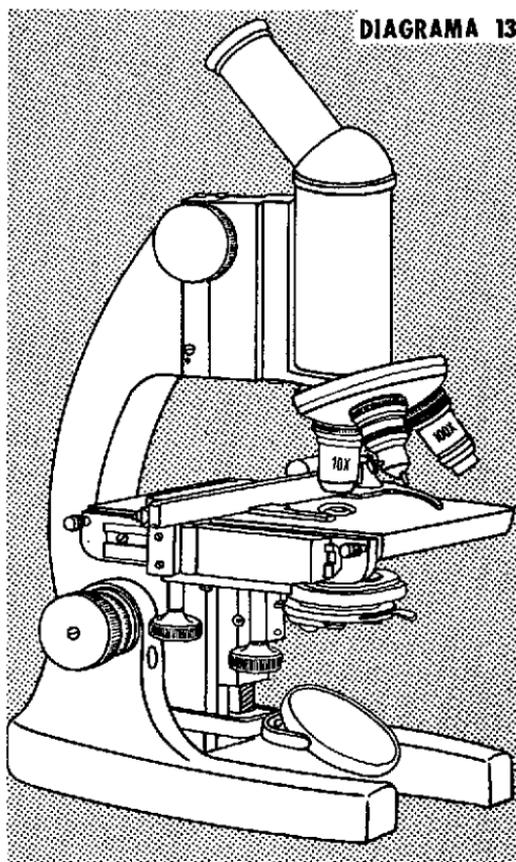
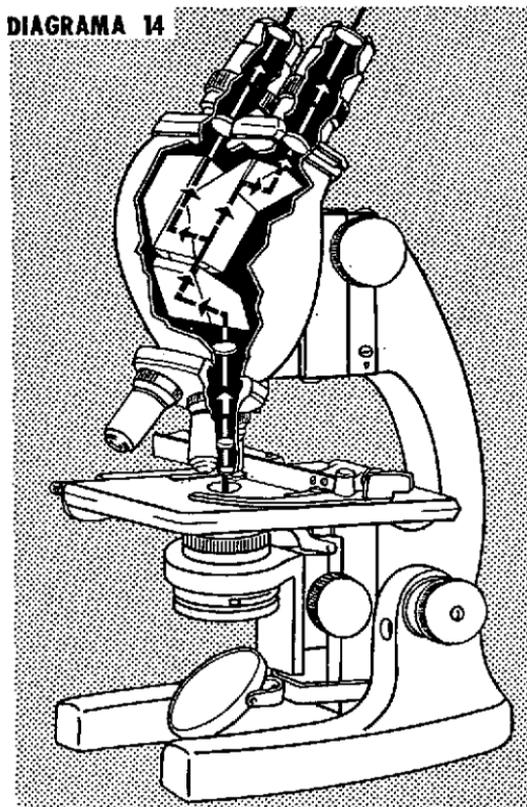


DIAGRAMA 14



proporcionalmente menor.

O microscópio binocular de corpo inclinado (Diagrama 14) permite ao observador usar o aparelho por períodos prolongados sem se fatigar tanto quanto com o aparelho monocular. O mesmo diagrama mostra que é necessário um número considerável de equipamento ótico para levar a imagem a ambos os olhos. Não só a luz total que alcança a lâmina através do espelho e condensador é dividida em duas, mas também cada lente ou prisma, no sistema binocular reduz a intensidade da luz que alcança cada olho. Está claro, pois, que o volume de luz que proporciona bons resultados no microscópio monocular pode ser insuficiente para o aparelho binocular.

Por outro lado, enquanto um simples movimento do parafuso micrométrico é suficiente para dar a nitidez máxima no aparelho monocular, no aparelho binocular é necessário ajustar primeiro o tubo móvel com o tubo fixo, para igualar a imagem nas oculares. Quando esses ajustes são feitos de modo adequado, obtém-se grau de nitidez que não é possível no aparelho monocular. Além disso, a fadiga é grandemente reduzida. O uso do microscópio binocular é dificultado pelo pêso extra da peça binocular, que tem a tendência, depois de certo tempo, a deslizar, desfocando o aparelho.

Alguns aparelhos binoculares, muitos dos quais de fabricação européia, podem aumentar mais a imagem. O aumento desses aparelhos, gravados em seus corpos, são de 1,25x, 1,5x, 1,6x e mesmo 2,5x. Se não houver marcação no corpo do aparelho, pode-se considerar que seu aumento é de 1x.

Não há distinção entre as características restantes dos microscópios monocular e binocular. Ambos têm um revólver (peça

giratória) de 3 ou 4 aberturas, nas quais são colocadas as objetivas usuais. A platina deve ter sobre si mesma ou incorporada a ela um tipo de prendedor de lâminas (carro mecânico ou "charriot") que possa mover-se mecânica e precisamente para trás e para a frente e de um lado para outro. Já que todo trabalho sobre malária requer busca sistemática, não se pode estar seguro se os mesmos campos são examinados repetidamente, *a menos que se use uma platina mecânica.*

A superfície superior da lente de cima do condensador "Abbe", pode ser vista através da abertura na platina. Quando em posição, essa lente deve ficar o mais próximo possível da superfície inferior da lâmina. A função do condensador é concentrar ao máximo, na parte superior da lâmina, toda a luz refletida pelo espelho plano através da grande abertura inferior do condensador. O espelho, fixado diretamente sob o condensador, serve para refletir raios de luz relativamente paralelos, da fonte de luz para o condensador. Para se obter o máximo de eficiência do condensador, *deve-se usar somente o espelho plano;* o espelho côncavo só é usado em operações nas quais se retira o condensador. As partes do microscópio que ficam abaixo da lâmina fazem parte do sistema de iluminação; as de cima têm a ver com o aumento e a resolução.

O aumento total obtido com o microscópio composto, quando se utiliza a objetiva de imersão (geralmente de 90x a 100x), pode variar de 450x a 1.500x, dependendo das oculares empregadas. A experiência tem demonstrado que a clareza de detalhes ou nitidez pode diminuir quando se ultrapassa o ponto ótimo de aumento com a ocular.

As objetivas que geralmente acompanham os microscópios são: a de pequeno aumento, de 10x; a média, de 43x; e a de imersão, geralmente de 100x. A objetiva de pequeno aumento pode ser usada para verificar a preparação de sangue no que se refere à sua disposição na lâmina, aspecto geral, coloração, bem como a distribuição dos leucocitos. A objetiva de 43x tem pouco uso em serviços de malária e deve ser por isso eliminada. Pode ser substituída no revólver por um tipo de objetiva demarcadora, usada para marcar com um círculo os elementos microscópicos, para exame posterior. O aumento total é determinado multiplicando-se os aumentos dos elementos óticos envolvidos, isto é, o aumento da ocular, do tubo binocular (se houver) e da objetiva. Quando ainda na fase de treinamento, os técnicos poderão obter melhores detalhes com *um aumento intermediário entre 600x e 800x.* Depois

de adquirida certa experiência, verificarão que um aumento de 500x acelera a velocidade de seus trabalhos, porque o volume maior de luz compensa a perda de detalhes derivada da diminuição da imagem. Podem-se, também, usar oculares de 5x em tubo de aumento superior a 1x. Outros aumentos das oculares são: 4,3x, 6x, 6,3x, 6,4x, 7x, 7,5x, 8x e 10x. A última é muito alta para o uso ordinário com a objetiva de imersão.

Nos últimos anos, tem-se tratado tôdas as superfícies das lentes e prismas expostas ao ar com um "revestimento"¹ que compensa a desigualdade de comprimento de onda das côres do espectro e reduz substancialmente a dispersão da luz. As lentes e prismas assim tratados podem funcionar adequadamente com muito menos luz do que os não tratados. As superfícies assim revestidas, quando vistas com luz incidente, podem ser distinguidas pela côr azul violeta. Esse tratamento nos microscópios modernos está-se difundindo cada vez mais. (Ver secção 12, Iluminação.)

Em climas quentes e úmidos é imperativo que os microscópios sejam guardados, durante a noite, em armário provido de lâmpadas elétricas ou de outro sistema de aquecimento que mantenha a temperatura entre 29° a 35° centígrados. A queda da temperatura abaixo desse ponto, ainda que esta continue superior à do meio ambiente, pode favorecer a formação de fungos. Esse acondicionamento simples evitará, portanto, o desenvolvimento dos micélios dos fungos nas superfícies das lentes e prismas. É preferível não guardar em suas respectivas caixas os microscópios usados diariamente. O pó da madeira costuma depositar-se nas superfícies dos prismas e nas partes superiores das objetivas de imersão, prejudicando a nitidez. Essa poeira pode ser, porém, removida com alguns jatos de ar de uma seringa de borracha comum.²

As vêzes, quando a temperatura da parte sólida do binocular desce durante a noite, ou por ter o aparelho estado fora de uso, e fica consideravelmente menor que a do corpo humano, a nitidez, embora boa a princípio, pode tornar-se repentinamente confusa. É que o calor do rosto do examinador aquece o ar que fica em volta dos prismas, no corpo binocular, e provoca súbita condensação de umidade nas superfícies frias. Essa condensação desaparece tão logo as temperaturas do ar e das superfícies se igualem.

Nos trópicos e outras zonas sujeitas a calor intenso, as oculares

¹ Película anti-reflexo.

² Ver Apêndice 19, pág. 113.

inclinadas oferecem a desvantagem de receberem a gordura proveniente das pestanas úmidas de suor. O hábito de lavar frequentemente o rosto com água e sabão corrigirá, em parte, essa dificuldade. A limpeza constante das superfícies expostas das lentes das oculares deve ser feita com pequenos pedaços de papel absorvente do tipo "Yes".

12. ILUMINAÇÃO

Os corpos microscópicos presentes nas lâminas são encontrados e examinados com luz direta do espelho, através do condensador. Essa luz passa através da preparação até chegar às oculares, que convertem os raios de luz em imagem reconhecível. Essa luz é chamada luz "transmitida", ao passo que a luz que permite o reconhecimento das faixas brancas dos palpos de um mosquito, com o simples microscópio estereoscópico, se chama luz "incidente" ou "direta". Os pigmentos sólidos e de várias côres do espectro aparecem com as mesmas côres na luz direta; com luz transmitida, porém, por serem sólidos, obstruem a passagem da luz e projetam-se em tons cinzentos ou negros.

A luz branca é constituída por tôdas as côres do espectro, como pode ser demonstrado com um prisma. Cada côr tem diferente comprimento de onda. Quando a luz branca encontra uma superfície de vidro, certa proporção de raios é refletida pela superfície lisa, mas não como luz branca; cada côr é refletida em ângulo diferente, de acôrdo com o comprimento individual das ondas. O efeito pode ser comparado com uma camada de pequenas bôlhas ou espuma numa superfície de água através da qual se deseja ver. A luz que passa através da água é obstruída por essa espuma. Sua presença torna necessário muito mais luz para observar o que está debaixo da superfície. O revestimento das lentes com uma película anti-reflexo reduz a um mínimo o reflexo confuso dos diferentes comprimentos de onda e permite trabalhar com uma fonte de luz menor da que é necessário quando as lentes não são revestidas. A economia de eletricidade compensa o gasto com o revestimento das lentes.

Os microscópios binoculares, com seus prismas e, muitas vêzes, com lentes adicionais, requerem uma quantidade enorme de luz, em comparação com os microscópios monoculares. A luz total

obtida divide-se entre as duas oculares; porisso, para o microscópio binocular é necessário pelo menos o dôbro da luz que o monocular requer. Assim, o revestimento no binocular é grande vantagem.

Parece que não há em medicina nenhuma outra pesquisa que demande tão alto grau de microscopia como o reconhecimento dos pequenos parasitos da malária numa gôta espêssa desmoglobinizada. Em geral, as pequeníssimas bactérias e outros organismos, depois de corados, mostram-se e fâcilmente se identificam num fundo de côr contrastante. Para o diagnóstico da malária, o fundo tem que ser tão claro e limpo quanto possível, para que contra o mesmo realcem os minúsculos corpos, de 0,5 a 2,0 micras de diâmetro, corados de vermelho e azul.

Em compensação, no esfregaço de sangue, os glóbulos vermelhos, achatados numa camada única sôbre a superfície lisa da lâmina, o que aumenta seu tamanho, podem ser identificados e examinados em detalhe com um mínimo de luz. Por essa razão, *o esfregaço nunca deve ser utilizado na avaliação* da quantidade adequada de luz e da qualidade da imagem. Para êsse fim, deve-se ter à mão uma gôta espêssa bem preparada e bem corada.

O campo microscópico—campo de imersão—deve estar sempre uniformemente iluminado com luz branca, ligeiramente azulada. O microscópio, a lâmpada e os filtros devem ser dispostos de modo a se obter o máximo de luz possível; em seguida, a luz pode ser diminuída à vontade do microscopista, com o auxílio do diafragma (íris) do condensador.

Houve tempo em que sòmente a luz do dia era considerada ideal para o microscópio da época, o monocular. Colocavam-se mesas junto às janelas que davam para o norte e regulava-se o espelho de modo a fazê-lo refletir a luz das nuvens brancas. Em tais condições, a luz do dia ainda é uma fonte de iluminação boa para o microscópio monocular, embora inconstante. Para o microscópio binocular, sòmente a eletricidade proporciona luz uniforme e constante. Cumpre não esquecer, porém, que a luz elétrica é, com frequência, bastante amarelada.

Existem vários tipos de lâmpadas para microscopia excelentes para a pesquisa da malária, porém há algumas que não servem. Deve-se ter em mente que muitas das lâmpadas de alta qualidade para microscópio são especificamente destinadas a microfotografia e não servem para os programas de erradicação da malária, onde se empregam aparelhos mais simples.

Não se deve, portanto, cogitar de aparelhos de iluminação que

dependem de lâmpadas de tipo especial; só os que empregam lâmpadas de fácil obtenção no mercado local devem ser considerados. Sempre que possível, devem-se converter as lâmpadas de soquetes especiais em comuns. Não se deve comprar microscópio com iluminação própria; mas quando já existe microscópio desse tipo pode-se adaptar ao mesmo um sistema de espelho e condensador.

Assim como não é possível fazer incidir a luz solar diretamente sobre o microscópio, devido aos seus reflexos, não se podem também usar lâmpadas de vidro transparente. Se a lâmpada do aparelho fôr desse tipo, deve-se usar, obrigatoriamente, um filtro de vidro fôsko, junto à lâmpada ou diretamente sob o condensador do microscópio. Quando a luz é de pouca intensidade, é preferível usar vidro fôsko mais fino; se a luz é mais forte, emprega-se vidro fôsko mais grosso. Frequentemente, o vidro fôsko é tão grosso que a luz que chega ao microscópio é insuficiente. Muitas vezes, o filtro de vidro fôsko vem combinado com um filtro azul, mas essa combinação pode reduzir demais a luz.

É necessário usar um filtro azul para obter um fundo branco ligeiramente azulado, indispensável à observação minuciosa dos leucocitos, parasitos e plaquetas. Frequentemente, os filtros azuis usados sob a platina são tão azuis que diminuem a intensidade da luz; combinados com um filtro de vidro fôsko reduzem demais a luz.

As lâmpadas de 110v geram calor na proporção do número de suas velas, de modo que se recomenda o uso de transformadores e lâmpadas especiais de baixa voltagem. Contudo, o aquecimento provocado pelas lâmpadas de 100 watts ou de menor voltagem pode ser tolerado com ventilação adequada. As lâmpadas desprovidas de quebra-luz não podem ser usadas por causa dos reflexos nos olhos do operador ou das pessoas que estão perto.

O que precede refere-se apenas às objetivas de imersão, já que muitos aparelhos de iluminação servem muito bem para patologia, exames de fezes, urina, etc., embora não produzam luz suficiente para as pesquisas de malária.

Bom exemplo de iluminação adequada *para o microscópio monocular* é a lâmpada fôska comum, do tipo chamado "luz do dia", de 60 watts; se a voltagem é boa, a de 40 watts é preferível à de 60. Colocada em soquete de porcelana e adequadamente tapada por três lados, essa lâmpada proporciona uma quantidade abundante de luz branca azulada, sem necessidade de filtros.

O microscópio binocular necessita de uma lâmpada de cerca de

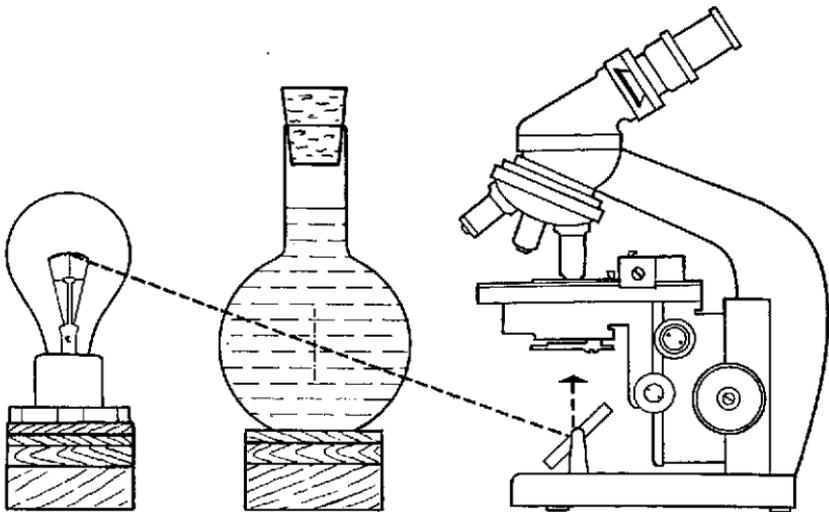
150 watts, mas como a intensidade do azul e da opacidade dessa lâmpada é o mesmo que o de uma de 60 watts, torna-se necessário acrescentar-lhe um filtro azul. Qualquer lâmpada de 150 watts produz calor demais, por isso, não é de uso prático. Os sistemas de iluminação que necessitam de uma série de filtros têm, em geral, uma lâmpada especial de vidro transparente como fonte de luz e não devem ser usados. O modelo antigo alemão A.H.T. Cat. No. 6958, usado para observação em campo escuro, é excelente para tal fim. As lâmpadas transparentes de 200 watts com seus suportes de filtros, não têm utilidade em campanha de malária, mas a lâmpada de 100 watts, No. 6958-E, fôska, é bastante satisfatória. Uma lâmpada de 100 watts, fôska, colocada por trás de um frasco de Florence de 250-300 cc, cheio de água, é o suficiente, se a água fôr levemente tinta de azul. Adiciona-se à água do frasco um número suficiente de gotas de solução de "luz do dia, artificial" (9 cc de solução de sulfato de cobre a 20% + 1 cc de anilina azul a 0,6%), para se obter um fundo branco ligeiramente azulado. O excesso de azul é pior do que a insuficiência, porque reduz grandemente a luz. Troca-se a água quando necessário. Ligeira turvação pode, às vezes, ser removida com algumas gotas de ácido acético ou amônia em solução forte.

A fonte de luz deve ser rodeada por qualquer material opaco, exceto no lugar onde os raios são dirigidos contra o espelho do microscópio. O aparelho de iluminação do tipo "Chalet" (da American Optical No. 361, *sem* vidro azul ou fôsko) pode controlar o reflexo e manter suspensa uma lâmpada de 60 ou 100 watts. O frasco com água azulada pode ser mantido na posição própria, entre a lâmpada e o espelho, por meio de blocos de madeira.

As instalações que acabamos de descrever podem ser facilmente improvisadas com papelão escuro (papel isolante), uma base ou soquete de porcelana e três metros de fio. Como se vê no Diagrama 15, a posição da parte mais brilhante da lâmpada, do centro do frasco esférico que atua como lente e do espelho e as respectivas alturas de cada um em relação ao outro são de grande importância para se obter ótimos resultados. Podem-se usar alguns blocos de madeira de 1-2 cm de espessura, para se obter a altura desejada da lâmpada e do frasco.

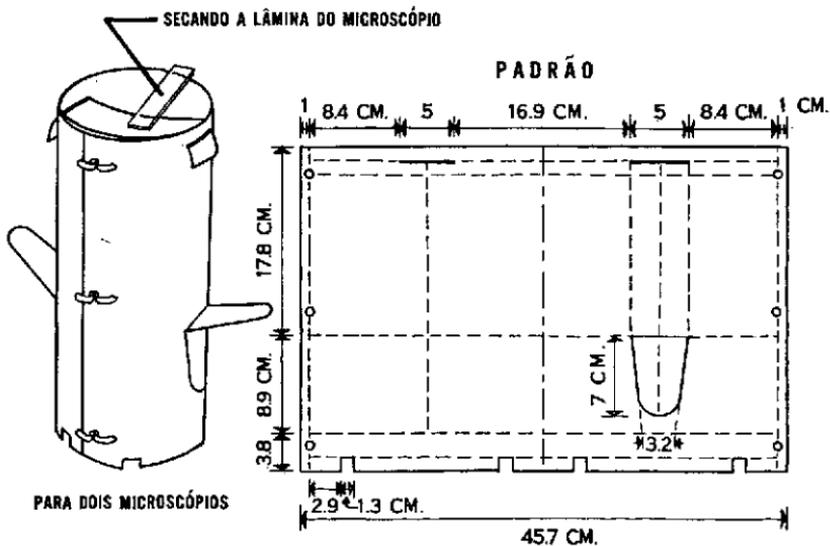
Um fotômetro que meça o número de velas por pé quadrado que chegam aos olhos do microscopista é muito útil para ajudar o estudante a obter o máximo de iluminação. O fotômetro "Photo-

DIAGRAMA 15



volt”, de exposição fotoelétrica, é instrumento valioso tanto para determinar a iluminação adequada ao microscópio como para demonstrar precisamente a quantidade de luz que atinge os olhos (ver Apêndice 21, pág. 115).

DIAGRAMA 16



O mesmo princípio visto no Diagrama 15 pode ser aplicado a uma lâmpada de confecção caseira, representada à esquerda do Diagrama 16. O diagrama representa, na escala, um quebra-luz montado por meio de grampos para papéis. Usam-se duas aberturas quando dois trabalhadores se sentam um em frente ao outro.

As lâmpadas fôscas de 100 watts variam consideravelmente, não só em tamanho e formato (especialmente comprimento) como também na quantidade de luz que emitem e no grau de deterioração pelo uso. Algumas marcas inferiores ficam tão escuras na superfície interna de vidro fôsko, que perdem 30% de sua eficiência. Quando a voltagem da rede é 10 ou mais volts inferior à voltagem especificada na lâmpada, pode ser necessário um regulador de voltagem para se obter o máximo de luz.

O daltonismo, conforme o grau, diminui a eficiência do microscopista. Seria conveniente os candidatos submeterem-se a um teste de percepção de côres, para o que as placas pseudoisocromáticas H-R-R são excelentes.

13. TÉCNICA DO EXAME MICROSCÓPICO

Para evitar êrros e perda de tempo, o microscopista deve acostumar-se a tomar sempre as seguintes precauções, de pouca importância na aparência mas essenciais na realidade, antes de empreender a pesquisa de parasitos:

1. Colocar uma pequena gôta de óleo de imersão próximo da borda da gôta espessa.

2. Verificar e registrar na fôlha de trabalho a identificação da lâmina, bem como quaisquer aspectos incomuns que encontre.

3. Colocar a lâmina entre as presilhas da platina mecânica e verificar se ficou firmemente prêsa à barra móvel da platina. Se isto não fôr feito, corpos suspeitos ou duvidosos podem-se perder antes de serem permanentemente localizados por um círculo feito com o marcador apropriado.¹

4. Examinar ligeiramente tôda a gôta espessa com a objetiva de 10x até encontrar área apropriada, onde os leucocitos sejam numerosos e aparentemente bem corados. Se fôr difícil localizar tal área, espalhar uma camada fina de óleo sôbre tôda a área corada

¹ Ver Apêndice 16, págs. 108-109.

e examinar outra vez, sistematicamente, com a objetiva de 10x.

5. Uma vez localizada uma área aceitável, colocar outra gota de óleo no centro da área iluminada. Girar o revólver, colocando a objetiva de 100x em posição. Inclinare a cabeça para um lado e usar o parafuso macrométrico para abaixar a objetiva no óleo até que sua extremidade toque de leve o vidro.

6. Aproximar os olhos da abertura da ocular e, ainda com o auxílio do *parafuso macrométrico*, levantar o corpo do aparelho até que os leucocitos se tornem visíveis. Levar para o centro do campo e focalizar bem com o parafuso *micrométrico* um leucocito polimorfonuclear bem corado e, de preferência, com plaquetas ao lado. Girar o parafuso micrométrico rapidamente, quase com violência, para trás e para diante, no espaço de 50 divisões do eixo, sem perder de vista o campo. Se com esses movimentos parecer que os leucocitos se estão movendo radialmente por pouco que seja, em qualquer direção, *parar*, reajustar o espelho ou sua altura ou a distância da fonte de luz, até que os leucocitos subam e desçam sem desvios nesses amplos movimentos da objetiva.

Os espaços entre os leucocitos devem ser claros, com um ligeiro tom azulado. Normalmente, a luz torna-se menos amarela e mais abundante depois dos ajustes. Caso contrário, é necessário repeti-los até obter o máximo de iluminação.

7. Limpar cuidadosamente as superfícies superiores das oculares com um pequeno pedaço de papel "Yes" ou outro tecido fino. O pó que se deposita na parte *externa* das lentes inferiores das oculares deve ser removido com um jato de ar. Na parte interna dessas lentes, o pó deposita-se mais lentamente. Ajustar as oculares à distância interpupilar exata, previamente determinada na escala, como, por exemplo, 68. Mover o tubo único da ocular ajustável para baixo e para cima, até conseguir a mesma nitidez em ambos os olhos.

8. Examinar os elementos do sangue normal descritos na seção 3, págs. 10-13. Anotar qualquer alteração da cor ou da aparência usual.

9. Somente quando os elementos normais do sangue aparecem em suas cores próprias, pode-se esperar que qualquer parasito presente tenha também suas cores próprias. Assim, se os núcleos dos leucocitos forem muito vermelhos em certa área da amostra, é improvável que se veja cor azul no citoplasma dos parasitos. Por outro lado, se os leucocitos forem muito azuis, não é provável que a cromatina do parasito apresente cor vermelha suficiente. Con-

tudo, não se deve deixar de considerar que ocasionalmente, onde a coloração dos elementos celulares é pálida ou deficiente, os parasitos podem continuar se destacando clara e distintamente por várias semanas.

10. Aprender a reconhecer tão depressa quanto possível a aparência e a côr do pigmento malárico, porque muitos corpos suspeitos, do tamanho de um pequeno linfocito ou maiores, podem ser imediatamente desprezados como possíveis parasitos, por não apresentarem pigmento algum.

11. Durante tôdas essas operações, observar sistematicamente se as células e outros elementos cuja coloração se examine aparecem ou não com imagens completas, boas e claras, isto é, se a nitidez varia de excelente para boa. Caso contrário, a causa deve ser removida antes de se continuar o exame.

Uma vez bem aprendidos os processos acima, é tempo de examinar a lâmina. Já que é costume pesquisar no mínimo 100 campos da gôta espessa antes de se dar o sangue como negativo, é aconselhável aprender com precisão o que constitui um campo microscópico prático.

Uma vez que poucos campos microscópicos aparecem inteiramente planos com a objetiva de imersão, seria muito demorado examinar minuciosamente todos os elementos na área iluminada. Qualquer elemento que requeira exame cuidadoso deve ser levado para o centro do campo, onde a nitidez é a máxima. *Na busca de parasitos*, o campo microscópico deve ser definido como a parte da área iluminada que se encontra tão nitidamente em foco quanto qualquer corpo localizado no centro exato. Isto não corresponde, às vezes, a mais do que dois terços da área iluminada.

Avaliada a utilidade do centro exato do campo, qualquer elemento em discussão pode ser levado para ali, de modo que são supérfluos os ponteiros ou as linhas em cruz das oculares.

Começando-se num dos bordos da gôta espessa, move-se a lâmina em ziguezague sob a objetiva, tão depressa quanto permita o exame adequado dessa área central. Cada nova área das mesmas dimensões que se examina é considerada um campo microscópico.

Para compensar as variações da capacidade de trabalho dos observadores, o exame de uma amostra deve ser regulado pelo número de campos pesquisados e não pelo número de minutos. A produção de microscopistas principiantes trabalhando sob a orien-

tação de um supervisor tem variado entre 39 e 215 campos examinados durante o mesmo período de tempo. Uma gôta espessa de 3 a 4 cm² pode conter 500 a 800 campos microscópicos. É óbvio que o exame total da preparação só deve ser feito em circunstâncias muito especiais, como em experiências com infecção e drogas. Quando os sintomas de um paciente febril são devidos à malária, encontram-se facilmente os parasitos, isto é, muitos em cada campo. Quando são raros, pode-se registrá-los pelo número encontrado em 100 campos microscópicos, como, por exemplo, 37/100 ou simplesmente 37 V (no caso de *vivax*).

Se o observador estiver examinando quase diariamente lâminas com preparações similares, a identificação da cromatina será automática. Mas se já há alguns dias não usa o microscópio, vale a pena identificar primeiro um bom número de parasitos comprovados, a fim de adquirir noção exata da densidade específica e característica com que a cromatina geralmente se apresenta. O diagnóstico de um único parasito na preparação deve ser feito com cautela; cumpre encontrar pelo menos três parasitos. Não se procuram mais formas específicas do parasito, mas tantos parasitos definidos quantos possam ser encontrados, para verificar o tamanho do menor, do maior e da maioria (ver Apêndice 4, págs. 95-96). Recomenda-se examinar pelo menos 50 campos de uma boa lâmina positiva para que não passe despercebida a evidência de uma infecção secundária.

Quando se deseja investigar qualquer aspecto *incomum* de parasito na gôta espessa, pode-se tirar e examinar um esfregaço, à procura de formas que possam explicar a aparência pouco frequente, como, por exemplo, as formas primárias dos esquizontes e pré-esquizontes, semelhantes a pneumáticos de automóvel, tanto do *vivax* como do *malariae*. É pouco prudente tentar o diagnóstico da espécie com apenas dois ou três parasitos no esfregaço.

14. REGISTRO E NOTIFICAÇÃO DOS RESULTADOS

Nos serviços que se dedicam exclusivamente à malária, é perda de tempo escrever *Plasmodium*, *Plas.* ou mesmo *P.* antes da espécie. Símbolos ou abreviaturas adequadas tomam menos espaço e dão menos trabalho; exemplo: F, Fg, V, M.

Combinando-se essas abreviaturas com o uso inteligente de números aproximados, distribuídos sob quatro rubricas apenas, pode-se registrar o quadro exato dos achados no sangue.

Assim, recomenda-se eliminar a abreviatura *P.* e a palavra “positivo”, que por si mesmas significam muito pouco. A palavra “negativo” é ainda aceita como indicação de que nenhum parasito foi encontrado em 100 campos da gôta espessa. Quando o boletim tem espaço para se indicar o número total das lâminas examinadas e as lâminas positivas são registradas por meio de referência numérica, não é necessário escrever “neg” após cada exame negativo. Basta colocar um ponto ou sinal convencional para indicar que a lâmina foi examinada.

A infecção pelo *falciparum* divide-se em três fases:

- | | |
|-------------------------|-------|
| 1. Anéis, somente | = F |
| 2. Anéis e gametócitos | = F+g |
| 3. Gametócitos, somente | = Fg |

Nenhuma outra explicação é necessária.

Quanto aos gametócitos das outras três espécies, não há necessidade de qualquer menção especial, bastando lembrar ao observador que os mesmos podem persistir através de vários ciclos, surgindo ao microscópio exemplares velhos e esmaecidos. Ao contrário do *falciparum*, não requerem medicamento especial para retirá-los da circulação. Tôdas as diferentes formas do ciclo de desenvolvimento podem ser observadas na circulação periférica, a qualquer tempo, durante as 48 a 72 horas de duração do ciclo, mas desaparecem quando o paciente toma um medicamento esquizonticida.

O único registro requerido para tôdas as formas do *vivax* é V; M para *malariae*; e Ov para *ovale*, espécie ainda não encontrada no Hemisfério Ocidental.

O importante é indicar o número aproximado de parasitos presentes. Não porque os números elevados indiquem infecções novas ou recentes e os baixos indiquem infecções mais antigas, mas tão somente porque o diagnóstico das espécies é, provavelmente, mais correto quando feito com os números altos do que com os baixos. A revisão da lâmina torna-se importante no caso de haver poucos parasitos.

Os números são mais ou menos os seguintes (os valores numéricos assinalados com ++ e +++ são meras aproximações):

Quando a média de parasitos é de 1 por campo = +

2 a 20 por campo = ++

21 a 200 por campo = +++

mais que 200 por campo = ++++

Quando o número de parasitos realmente encontrados em 100 campos varia entre 40-60 = $\frac{+}{2}$

Qualquer número inferior a 40 em 100 campos deve ser escrito por extenso; exemplo: 33

Quando distribuídas em quatro colunas, essas aproximações ou números reais podem ser usadas para o diagnóstico exato de qualquer combinação das espécies; exemplo:

F	Fg	V	M
++	14	•	•
•	•	+++	•
•	37	++	•
•	29	•	++
•	•	$\frac{+}{2}$	9

Numa lâmina registrada como negativa, admite-se que o serviço de revisão encontre no máximo três parasitos em cada 100 campos re-examinados. Essa é a margem de erro admissível. Até esse limite, manda-se ao examinador apenas uma notificação do achado, em vez da papeleta de "diagnóstico errado" que se lhe envia quando o resultado por êle apresentado é incorreto.

15. ROTEIRO GERAL PARA O EXAME DE LÂMINAS CORADAS

1. Ajuste o banco na altura que lhe proporciona mais comodidade.
2. Limpe tôdas as marcas de dedos, pó ou óleo de todo o microscópio com um pano macio ou lenço de papel. Verifique se a platina mecânica se move livremente em ambas as direções. Se não se mover, retire-a e limpe-a tanto na parte inferior como na parte superior. NÃO USE ÓLEO. Use vaselina em tôdas as superfícies móveis.
3. Verifique a solução no frasco, a qual deve ser transparente e não muito azulada.
4. Feche o diafragma (íris) ligeiramente, quando usar a objetiva 10x; abra-o quando utilizar a objetiva 100x.
5. Use a mão esquerda para a focalização constante do parafuso micrométrico e a mão direita para mudar os campos por meio dos botões da platina mecânica. A focalização constante é *uma necessidade* nas gôtas espêssas.
6. Reveja os aspectos do sangue (ver pág. 10) para facilitar a avaliação da qualidade do corante e o reconhecimento de parasitos, se existirem.
7. Quando completar o exame de cada lâmina, remova todo o óleo e marcações de lápis de cêra, esfregando-a suavemente com um pano umedecido em tolueno. Para um grande número de lâminas, é preferível usar um vidro de boca larga de 60 ml cheio de tolueno. Retire primeiramente o excesso de óleo na lâmina com papel tipo "Yes"; mergulhe a lâmina no vidro com tolueno e depois limpe-a suavemente com um pedaço de papel "Yes", sêco.
8. Findo o expediente, retire a última lâmina e gire a objetiva 10x até que ela fique diretamente sôbre o condensador. Abaixar a objetiva até tocar na trava automática. Remova o óleo da objetiva 100x.
9. Mova a platina mecânica até ficar na posição central.
10. Cubra o aparelho com o protetor de pó e coloque-o de nôvo em seu lugar numerado, no armário-estufa.

16. LÂMINAS DE MICROSCOPIA

As lâminas são objetos tão comuns e conhecidos que a maioria das pessoas parece acreditar que se trata de peças de vidro de comprimento, largura, espessura e qualidade uniforme. Tal não acontece, porém. Lâminas de diferentes fabricantes, bem como de diferentes países, variam ligeiramente na espessura,¹ comprimento e largura.² Antes de se fazer uma encomenda de lâminas para microscópio, deve-se considerar cuidadosamente a maneira como serão utilizadas. Estarão sujeitas a lavagem e secagem com fortes esfregões? Serão enviadas a lugares distantes, de diferentes maneiras? Serão armazenadas e depois distribuídas? Pode ser necessário transportar as amostras de sangue a longas distâncias, em jipe, cavalo, barco ou mesmo a pé. Essas amostras podem ter custado alguns níqueis, mas também podem ter custado somas consideráveis. Passarão por várias mãos antes de serem finalmente examinadas, revisadas e arquivadas para futura referência. As lâminas precisam, pois, ter resistência para permanecerem intactas após suportar tôdas essas operações. Tomados em consideração todos êsses pontos, é pouco provável que se dê maior importância ao preço que à qualidade.

Quando só se dispõe de uma grande quantidade de lâminas já usadas, deve-se examinar uma por uma. As que apresentarem mesmo um princípio de oxidação devem ser descartadas e as restantes separadas em grupos idênticos de côr, espessura, comprimento e largura. Êsses grupos podem então ser lavados e empacotados de acôrdo com as instruções que aparecem abaixo.

Uma das melhores lâminas que se podem encontrar são as "Micro-slides", Red Label, Special, A.H.T. No. 7030, não corrosivas. São bastante uniformes e resistentes. Sua espessura é de 1,10-1,30 mm. Têm os bordos polidos e cantos ligeiramente arredondados; os bordos longos são ligeiramente biselados, o que reduz grandemente o risco de a pessoa se cortar ao limpá-las. As lâminas "clínicas" No. 7030-C são idênticas, faltando-lhes apenas o biselado.

¹ 0,8-1,3 mm. Meça 10 lâminas para obter a espessura média.

² 77 x 27, 76 x 26, 76 x 25, 75 x 25 e 74 x 24 mm.

Existem no mercado várias marcas de lâminas “pre-cleaned” (prèviamente limpas). Se se ajustarem às especificações acima, se demonstrarem ser suficientemente limpas para com a coloração Giemsa e se forem livres de gordura, pode-se experimentá-las. Talvez seja possível limpá-las com álcool a 90% e utilizá-las, mas são caras.

A lâmina denominada “segurança” (safety grip), de bordos irregulares, é também delgada (menos de 1 mm de espessura). É duvidoso que essas lâminas se limpem tão bem quanto as de bordos polidos.

As lâminas novas, que nunca foram usadas, mas que ficaram guardadas durante meses, embora em condições favoráveis, podem apresentar distintos graus de oxidação. É preferível não usar essas lâminas em diagnósticos de malária embora sirvam para outros trabalhos.

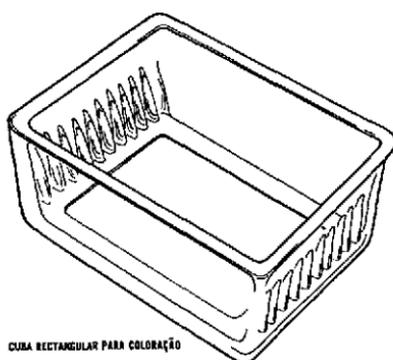
As lâminas novas são, em geral, recebidas em caixas de papelão contendo 72 lâminas, nas quais sobra ainda um pequeno espaço. Enchendo-se êsse espaço com certo número de lâminas limpas—em geral, 3 a 8—a caixa torna-se um volume satisfatório e cômodo para transporte ou armazenagem. Para a remessa pelo correio, essas caixas devem ser reforçadas com uma camada única de papelão ondulado e embrulhadas em papel forte. Tôdas as caixas vazias devem ser guardadas para êsse fim.

Limpeza das lâminas de microscopia

A coloração de parasitos da malária e outros no sangue é, na realidade, uma reação química muito delicada, que se altera facilmente em contacto com ácidos ou álcalis diluídos, sabões, desinfetantes e matérias absorventes, tais como sôro ou suor sêco. Qualquer vestígio de gordura ou óleo dificulta a penetração do corante e constitui a causa mais comum de o sangue se desprender da lâmina em pequenos flocos na ocasião da coloração.

Por essa razão, até agora ainda não se encontrou forma de simplificar a limpeza de lâminas. Não é suficiente polir muito bem suas superfícies; é necessário esfregá-las sempre, firmemente, com um pano limpo, até que nada fique aderido ao vidro. Na realidade, a pressão feita para atingir êsse fim é tanta que alguns aprendizes quebram, com freqüência, muitas lâminas, quando estão apren-

DIAGRAMA 17



CUBA RECTANGULAR PARA COLORAÇÃO

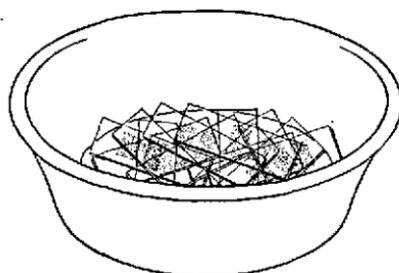
dendo a limpá-las corretamente. A boa limpeza das lâminas também reduz o número de elementos que podem aparecer em qualquer preparação sangüínea e causar confusão.

É quase universal a crença de que as lâminas novas, de uma caixa recém-aberta, são as que prestam melhor serviço. Tal não acontece, porém, pois as lâminas novas são, muitas vêzes, contaminadas por matérias químicas durante o processo de polimento, às quais são raramente removidas pela lavagem ou imersão prolongada das lâminas em água limpa, antes de serem estas comprimidas umas contra as outras para expelir o excesso de água.

As cubas de coloração que mantêm as lâminas separadas uma das outras durante o processo de lavagem, imersão e enxaguadura são indispensáveis (Diagrama 17). Essas cubas têm uma tampa que se ajusta frouxamente e encaixes para manter as lâminas separadas (A.H.T. 9194). Cada pesquisador deverá ter pelo menos quatro dessas cubas. Uma só tampa pode servir para as quatro, empilhadas umas sôbre as outras.

Quando o número de lâminas a serem lavadas é grande, as cubas de coloração tornam-se pouco práticas, donde a necessidade de serem distribuídas numa bacia vazia de modo que a água alcance tôdas as superfícies (Diagrama 18).

DIAGRAMA 18



Lâminas novas. As lâminas novas são tratadas mediante sua coloração em cubas de vidro que as mantenham separadas umas das outras e imersas pelo menos 12 a 24 horas em líquido para limpar vidro, preparado da seguinte maneira:

Bicromato de potássio	60 gm
Ácido sulfúrico (concentrado, 95-98% H_2SO_4)	300 cc
Água	400 cc

(Adicione o ácido à água *muito* lentamente mantendo, se possível, o frasco sob água corrente para resfriá-lo).

O líquido para limpar vidro deve ser conservado em vidro de tampa esmerilhada claramente marcado "PERIGO—evite contacto com as mãos ou roupas".

A solução deve ser recolocada no vidro por meio de um funil de vidro; e as lâminas, ainda na cuba, devem ser muito bem lavadas em água corrente ou, se não houver água corrente, em repetidas trocas de água, até que todos os vestígios de ácido tenham desaparecido. Se houver água destilada em abundância, enxágüe finalmente as lâminas com ela e depois enxugue-as fazendo pressão firme dos dedos no sentido longitudinal. Essas lâminas são colocadas uma a uma sobre um papelão, mesa ou banco limpos, para permitir a secagem completa dos bordos. Recentemente, duas remessas de lâminas novas pareciam ter uma fina camada de cêra que resistiu à passagem por ácido relativamente fraco. Soluções ácidas mais fortes não produziram nenhum efeito. Após a lavagem, foram postas durante a noite numa solução detergente e o resultado foi o completo desaparecimento do revestimento de cêra. Se duas ou três tentativas só com o detergente demonstrarem que as lâminas ficam realmente limpas, deve-se então desprezar o processo da passagem no ácido.

Se essa operação fôr executada de maneira adequada, não há necessidade de outra imersão em álcool de boa qualidade para eliminar completamente a gordura. Quando se usa álcool, é necessário secar as lâminas antes de colocá-las no mesmo. Depois de secas, as lâminas são firmemente empacotadas em blocos de 10, 15 ou 20 (se forem finas), ficando assim prontas para uso. É conveniente marcar a data em que o pacote foi feito, pois, conforme a umidade e a contaminação do ar pela exaustão de gases de motor, as lâminas conservadas em pacotes durante vários meses necessitam de lavagem antes do uso.

Lâminas usadas. Tôdas as lâminas, após o primeiro exame, retêm certa quantidade de óleo de imersão. Desejando-se preservar a lâmina para outras verificações, pingam-se sôbre ela algumas gôtas de tolueno de boa qualidade, e coloca-se a lâmina numa estante de madeira, para secar. Processo melhor é usar um vidro de bôca larga de 60 cc, cheio de tolueno, para remover o óleo que não pode ser retirado pela absorpção ativa do lenço de papel. As lâminas são embrulhadas em papel cebola de 11 x 21 cm, e sua identificação é escrita com lápis prêto no envoltório. As gôtas espêssas coradas e cobertas com óleo estragam-se rãpidamente quando deixadas espalhadas sôbre a mesa de microscopia ou expostas à luz solar.

Para lavar as lâminas, é preciso uma vasilha de vidro, esmalte ou plástico (Diagrama 18) de pelos menos 10 cm de profundidade, que se encherá até a metade com uma solução forte (5%) de sabão ou detergente ($\frac{1}{2}$ %), dentro da qual se colocarão as lâminas. Qualquer produto de limpeza para laboratório, tal como o A.H.T. No. 3298, é menos prejudicial para as mãos de que os detergentes comerciais de concentração normal. Nunca se devem deixar as lâminas em vasilhas rasas, como bandejas ou cubas chatas, que são quase sempre postas de lado e esquecidas, até que a evaporação lenta da água ou da solução acaba corroendo a superfície da lâmina e deixando-a irremediavelmente marcada. Nunca se devem deixar as lâminas mais de 3 dias em água pura, porque depois dêsse tempo a água se torna viscosa, formando-se na sua superfície uma espuma desagradável. As lâminas que se encontram em solução detergente ou de sabão podem ser transferidas, ao fim de 2 ou 3 dias, para um recipiente maior e mais fundo. Se, ainda úmidas, essas lâminas forem passadas entre o dedo polegar e o indicador, a maior parte do sangue corado e do óleo ficará no primeiro recipiente. Tais lâminas podem ser reunidas numa solução fraca de detergente para armazenamento, mas para que fiquem bem limpas é necessário separá-las uma por uma ou então manipulá-las nas cubas de coloração acima mencionadas.

As cubas devem ser colocadas sob água corrente durante meia hora ou sua água deve ser trocada 20 vezes. As lâminas novas podem ser colocadas em água corrente, passadas levemente entre os dedos e enxaguadas em água corrente por mais $\frac{1}{2}$ hora.

Depois que as lâminas usadas foram expostas ao óleo, é às vezes muito difícil livrá-las da gordura. Uma vez retiradas da água e deixadas secar *completamente* devem ser colocadas em álcool a

90-95%, enxutas com um pano limpo e empacotadas. O álcool pode ser usado várias vezes se fôr filtrado cada vez que retornar à garrafa estoque.

Comentário. Tudo isso pode parecer muito trabalhoso, mas a pessoa se convence da necessidade absoluta dessa meticulosidade ao ver um lote de lâminas preparadas por um ajudante descuidado, nas quais, feita a coloração, fica apenas um anel de sangue da amostra, colhida, às vezes, de uma pessoa que então se encontra a mais de 100 quilômetros de distância.

A prática bacteriológica de flambar as lâminas antes do uso não é necessária e pode, além disso, torná-las mais quebradiças e mais sujeitas à corrosão. A fervura é igualmente desnecessária.

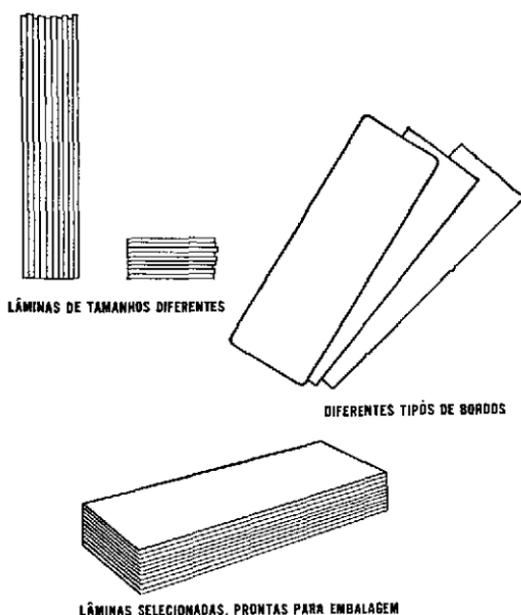
As lâminas limpas podem ser guardadas em frascos de boca larga de 5 cm de largura por 10 de altura, submersas em álcool de 90-95 por cento. Quando tenham que ser usadas mais tarde, enxugá-las com panos limpos, especiais para vidro, e empacotá-las.

Importância da limpeza das toalhas para a vidraria. Para se obter a condição de escrupulosa limpeza da vidraria, deve-se dispor de uma quantidade suficiente de toalhas de tecido de algodão que não desprenda muita fibra. A fazenda não deve ser nem muito grossa nem muito fina e é necessário lavá-la repetidas vezes para remover a goma que contém. O tecido, semelhante ao morim, é cortado em pedaços de 40 x 60 cms e suas bordas são dobradas. Essas toalhas não devem ser usadas para nenhum outro fim que não seja a secagem da vidraria; nunca se deve usá-las para enxugar as mãos ou o rosto ou para limpar a mesa de microscopia ou a pia.

Esses panos, quando usados unicamente para a vidraria, raramente ficam manchados. Contudo, devem ser freqüentemente lavados, uma vez que as mãos transpiram constantemente, em grau maior ou menor, dependendo do clima, e o suor é absorvido pela fazenda.

As toalhas sujas são mergulhadas em água e são bem ensaboadas com sabão de boa qualidade. Pode-se, também, imergi-las numa solução forte de detergente e deixá-las na mesma 15 a 30 minutos ou tôda a noite. Depois de revolvê-las bem e esfregá-las com força nos lugares onde existir manchas, enxaguá-las, trocando várias vezes a água, até que todos os traços de sabão ou detergente tenham desaparecido. Quando houver abundância de água destilada,

DIAGRAMA 19



é aconselhável enxaguá-las finalmente nessa água. Nunca se deve usar goma; as toalhas lavadas em lavanderias comerciais devem ser sempre enxaguadas antes do uso. Não precisam ser passadas a ferro, a não ser quando se quer apressar a secagem.

Empacotamento de lâminas depois de lavadas e secas.

Depois de lavadas e secas, as lâminas usadas devem ser separadas em grupos de igual tamanho (comprimento, largura e espessura) e côr, antes de serem firmemente empacotadas em blocos de 5, 10 ou 15 lâminas. Se êsses blocos contiverem lâminas não uniformes, o papel que os envolve logo se rasga. O Diagrama 19 mostra a diferença entre um bloco de lâminas selecionadas e um de lâminas não selecionadas.

Não é recomendável guardar as lâminas nas caixas de madeira convencionais, com capacidade para 25, 50 ou 100 unidades, porque as lâminas ficam expostas à poeira cada vez que se abre a

caixa. A movimentação desta produz pó de madeira ou mesmo pó de vidro e as caixas maiores, além de volumosas, requerem refôrço extra para transporte ou remessa postal. Cada laboratório central deve ter uma a três caixas dessas para guardar lâminas de pronta referência para observação e treinamento.¹

Manipulação, armazenamento e transporte de lâminas

Uma vantagem da moderna embalagem de mercadorias é que o conteúdo de um pacote é arrumado de tal maneira que serve de refôrço para o invólucro; isto é, as caixas de papelão, relativamente frágeis, tornam-se firmes graças ao apoio que lhes dá o conteúdo. Com exceção da embalagem de aparelhos pequenos e extremamente delicados, as caixas de madeira ou metal com seus acolchoamentos macios foram inteiramente substituídas pela embalagem de caixas de papelão bem compactas, que economizam pêso e espaço.

Tão logo estejam completamente sêcas, as lâminas recém-preparadas devem ser postas em pacotes compactos e firmes, de 8 a 15 lâminas, no máximo, como se vê no Diagrama 20.

Qualquer papel de cópia, fino e resistente, como o papel cebola, pode ser cortado, preferivelmente com guilhotina de imprensa, na medida de 11 x 21 cm e guardado entre pedaços de papelão forte das mesmas dimensões. Colocam-se 50 fôlhas dessas entre dois pedaços de papelão e comprime-se o pacote com um elástico, para que as fôlhas se mantenham planas e perfeitas. Quando se destinarem a pacotes individuais de 5 lâminas ou menos, as fôlhas devem ter 12 cm de comprimento.

Coloca-se o número prèviamente determinado de lâminas unificadas no sentido da menor dimensão do papel, deixando-se para cada lado a mesma margem de papel. Enrola-se o papel sôbre três lados do bloco de lâminas, segurando-se firmemente a parte distal do papel, de modo que o embrulho possa ser terminado rolando-se o bloco de lâminas como uma só unidade em direção à parte livre do papel. Em seguida, dobram-se cuidadosamente as pontas do papel, comprimindo-se as mesmas contra as extremidades do pacote. Vê-se agora a importância dos bordos iguais, pois que o

¹ Ver Apêndice 11, págs. 103-104.

pacote compacto e bem ajustado pode manter-se de pé sôbre uma ponta.

Qualquer tentativa de introduzir papel entre as lâminas contraria o princípio da embalagem. O método de envolver as lâminas em papel higiênico resulta em pacotes frouxos, comparados com o que acaba de ser descrito. Além disso, é um papel difícil de manusear. As lâminas que contêm esfregaços de sangue resistirão melhor o transporte quando empacotadas segundo o método aqui recomendado, que reduz ao mínimo o atrito entre elas.

Tôda a identificação necessária pode ser escrita com lápis macio num dos lados do pacote correspondentes aos bordos das lâminas, evitando-se assim ter que abri-lo para identificação. Os pacotes de lâminas recém-limpas devem trazer também a data em que foram limpas. Guardam-se êsses blocos ou pacotes de lâminas nas caixas de papelão em que foram recebidas, utilizando-se para isso a caixa aberta ou sua metade inferior e a tampa. Pequenas fôrmas de fôrno, de 18 x 28 x 3,5 cm, podem ser usadas para guardar tantos pacotes de lâminas quantos comportem, levando-se em consideração o pêso e a facilidade de manuseio.

A caixa de papelão para lâminas, cheia de pacotes, é a embalagem mais compacta e cômoda para manuseio e transporte. É

DIAGRAMA 20

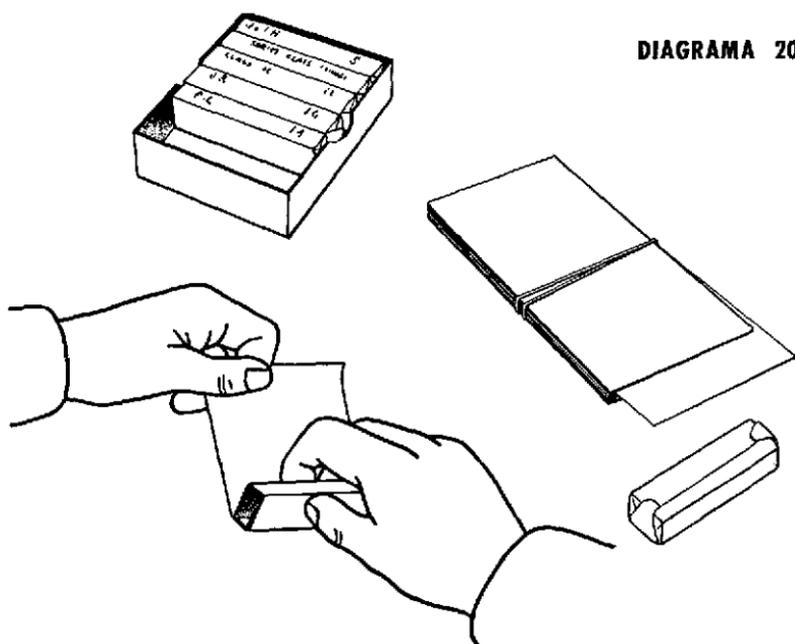
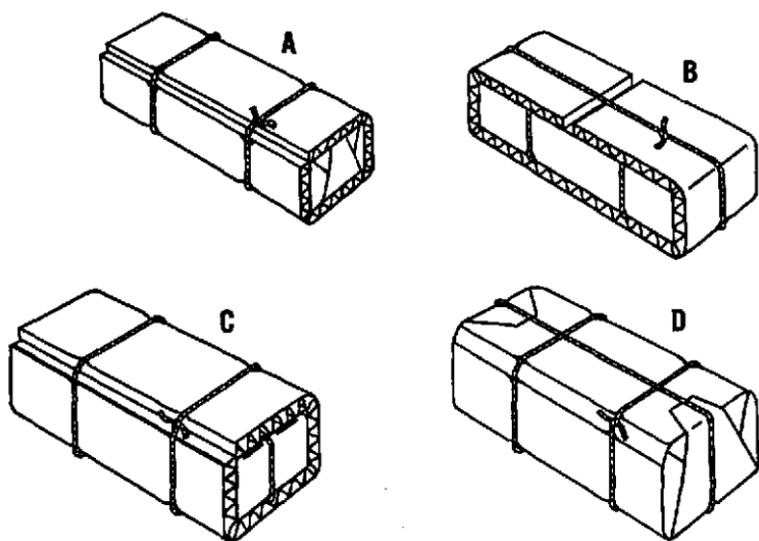


DIAGRAMA 21



necessário apenas colocar um papelão ondulado bem cortado cobrindo todos os seus lados fortemente atado com um barbante, antes de embrulhá-la em papel resistente.

Pacotes avulsos ou quantidades de lâminas que não sejam suficientes para encher uma dessas caixas podem ser embalados separadamente empregando-se tiras de papelão na largura apropriada. Para cortar o papelão ondulado, usa-se uma lâmina de barbear do tipo "Gem", adaptada num cabo, ou, de preferência, um cortador de papel de tipo pesado. Há no mercado tiras já cortadas em larguras que variam de 2,5 a 7,5, em aumentos sucessivos de 0,5 cm. As canaletas devem ficar em posição transversal e o comprimento não deve exceder 60 cm. Os pedaços são cortados de acordo com o bloco ou blocos de lâminas. As tiras são colocadas alternadamente em cada eixo longitudinal e amarradas em separado, até cobrir todo o conteúdo (Diagrama 21). O volume é, em seguida, embrulhado em papel. Esses pacotes podem resistir a uma queda de grande altura sobre metais, pedras ou cimento.

Embalagem comum para o envio de apenas uma ou duas lâminas é a caixa de madeira reversível A.H.T. 7056. Remetidas aos pares ou em séries, necessitam apenas ser embrulhadas em papel. Entretanto, para maior segurança é melhor colocar uma camada de papelão protegendo cada um de seus lados, antes de embrulhá-las em papel resistente.

Deve-se ter sempre em mente que a amostra de sangue na lâmina representa considerável gasto de tempo e esforço, bem como, às vezes, uma viagem da pessoa que a tomou. Deve-se fazer todo o possível para evitar o desperdício desse trabalho por perda ou quebra da lâmina.

As caixas de papelão de Adams A-1615, para embalagem de 2-4 lâminas, são úteis para o pessoal de campo, pois protegem as lâminas contra moscas, etc., enquanto não são secas e guardadas em pacotes provisórios.

As bandejas Adams A-1605 para 20 lâminas permitem distribuir e recolher rapidamente as lâminas para estudo ou treinamento.

A excelente caixa para 25 lâminas feita de polistireno por LaPine Co. (A. H. Thomas No. 7059-B) serve para o manuseio rápido de lâminas de treinamento. Há mais espaço entre as lâminas do que nas caixas comuns de baquelite e o polistireno é menos quebradiço.

As caixas de madeira comuns para lâminas, com ranhuras para 25, 50 ou 100, são mais úteis para o armazenamento de lâminas de demonstração e de material especial do que para uso no campo, onde as lâminas ficam expostas a poeira, umidade e moscas, até que todas sejam usadas.

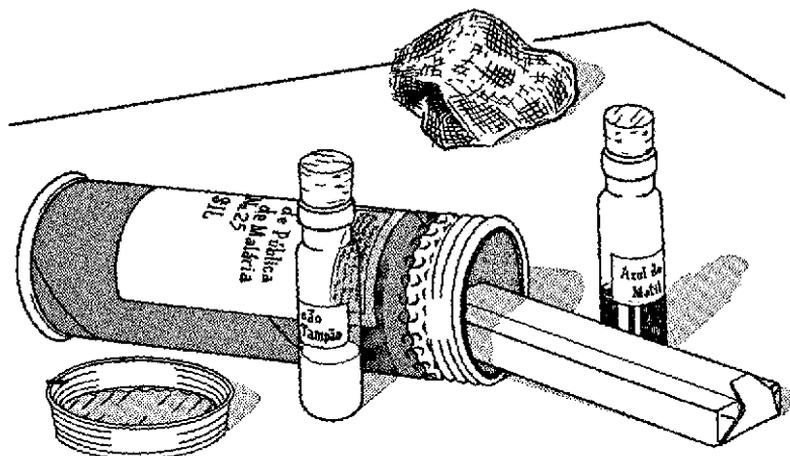
As lâminas positivas e de outro material excepcional de particular interesse devem ser guardadas de maneira uniforme e claramente rotuladas, do modo a se identificarem sem dificuldade os indivíduos ou grupos a que pertençam.

Encontram-se na praça recipientes de papelão tubulares de 12 x 3 cm com tampa de rêsca e base metálicas. Nesses recipientes cabe um pacote de 15 lâminas ou dois de 7, com as respectivas fichas bem dobradas.

Esse mesmo recipiente pode ser usado para lâminas e vidros destinados aos colaboradores localizados em regiões tão distantes que as lâminas com sangue não podem chegar ao laboratório em menos de 5 dias. Leva um pacote de 3 lâminas limpas, 3 fichas dobradas e dois vidros pequenos, de 4,5 x 1,2 cm, bem arrolhados (ver Diagrama 22). Um dos vidros contém 5 cc de solução

fosfatada de azul de metileno e o outro, saís em quantidade suficiente (0,2 gm) para serem dissolvidos numa garrafa tipo Coca-Cola ou de cerveja, cheia de água destilada ou de chuva, para fazer água tamponada.

DIAGRAMA 22



Embalagem para conservar em congelador. Depois de muito bem secas, as gotas espessas não coradas são cuidadosamente embrulhadas em papel cebola, formando-se pacotes de 15 unidades no máximo. As pontas dobradas são coladas com fita plástica de 1 cm de largura cortada em pedaços de 2,5 cm de comprimento.

Em seguida, o pacote é embrulhado em papel de alumínio de 22 x 11 cm, cujas sobras laterais se fecham contra o pacote, bem comprimidas.

A descrição do conteúdo é dactilografada em papel branco forte e colocada sobre os bordos das lâminas, antes de se envolver o volume em papel impermeável de 28 x 12 cm, de tal modo que a identificação possa ser vista através desse papel. As pontas dobradas são também fixadas por pequenos pedaços de fita plástica.

PARTE IV

Serviços de laboratório

17. SERVIÇOS DE LABORATÓRIO

A finalidade de um laboratório de diagnóstico da malária é examinar proficientemente o maior número de amostras de sangue, dentro do menor prazo possível. Cabe-lhe, além disso, a responsabilidade de tudo quanto diga respeito a êsse trabalho especializado.

Cumpra ter-se sempre em mente que o exame de uma amostra de sangue para pesquisa de parasitos é em verdade uma prova bem pouco satisfatória quando os parasitos presentes são muito poucos. Portanto, deve ser adotado um tipo de exame mínimo, como, por exemplo, 100 campos microscópicos por amostra, de modo que não se perca tempo com exames de sangues negativos.

Para que um serviço de laboratório funcione satisfatoriamente, é importante que todo o pessoal de supervisão saiba exatamente o que se espera dos microscopistas e quais são as suas limitações. Os chefes imediatos devem receber instrução técnica suficiente para que possam descobrir pequenos desvios dos métodos de laboratório prescritos e corrigi-los antes que afetem a qualidade geral do trabalho. Um exemplo disso é o caso do trabalhador que pede ou usa algum produto contido num frasco sem rótulo, talvez dado a êle por um servente ou qualquer outra pessoa inexperiente.

É necessário determinar previamente os princípios e práticas e padronizar todos os procedimentos, sempre que possível. As modificações que derem melhores resultados podem ser comprovadas no laboratório central e adotadas imediatamente depois de consideradas satisfatórias. Essa rígida uniformidade permite a rápida inspecção do equipamento e dos métodos e o fácil intercâmbio de pessoal para períodos provisórios de observação, estudo ou substituição.

Pessoal

Chefe do serviço de laboratório. Deve-se dar preferência a um médico para êsse pôsto e escolhê-lo mais por sua capacidade e energia que pelos títulos e cursos que possua.

Êsse chefe de laboratório deve devotar seu primeiro mês à prática dos procedimentos do laboratório; deve inspecionar minuciosa-

mente os locais, instalações, microscópios, lentes e todo e qualquer equipamento de cada laboratório sob sua supervisão, verificando, nessa oportunidade, as limitações dos mesmos. Deve exigir o maior grau de limpeza e entender e resolver qualquer dificuldade que se apresente. Deve também investigar qualquer deficiência dos métodos ou de material e corrigi-la devidamente. Deve ser a pessoa chave na contratação de colaboradores.

Tecnico-chefe. Neste caso também é mais importante a capacidade e a energia que os diplomas e os títulos. Esse funcionário é responsável pelo laboratório central e por todos os diagnósticos. É ele quem confirma tôdas as lâminas positivas e ocasionalmente uma negativa, e supervisiona todos os registros e relatórios.

Microscopistas. O número de microscopistas depende do volume de trabalho mensal, na base diária de um mínimo de 75 exames de gôta espessa por microscopista, mais o pessoal adicional necessário à substituição desses funcionários nos períodos de férias e de excesso de trabalho. Todo microscopista em período de treinamento deve passar pela prova de reconhecimento das côres.

Serventes. Esse pessoal deve ser bem instruído sôbre as precauções especiais que devem ser tomadas nessa espécie de trabalho. Aos que mostrarem interêsse espontâneo, deve-se dar a oportunidade de trabalhar com o microscópio tão logo estejam familiarizados com a rotina.

Pessoal de escritório. Esse pessoal é constituído por escriturários, arquivistas e secretários, segundo os métodos usados em cada serviço e o volume de trabalho.

Treinamento de pessoal

O treinamento de pessoal não deve limitar-se a um curso preparatório oficial; deve ser um processo contínuo. O estudante necessita pelo menos de 6 meses de estágio no exame rotineiro de lâminas, para se familiarizar com os vários aspectos do sangue. O laboratório central pode funcionar como centro de treinamento onde técnicos procedentes de distritos afastados e de laboratórios particulares se revezem depois de aprender os procedimentos e critérios modernos.

Durante êsse treinamento, deve-se dar maior atenção à gôta espessa e não ao esfregaço. Deve-se dissuadir o estudante de mencionar os termos clássicos e antiquados como *accolé*, *faixa*, “*infecções mistas*” e outros. Cumpra-lhe aprender a terminologia atual e o diagnóstico preciso. Nesse diagnóstico estão incluídas as três fases distintas do *P. falciparum*. Em lugar de anotar “*infecções mistas*”, deve indicar claramente as espécies dominantes e subordinadas, por meio de abreviações (ver seção 14, pág. 63). Uma vez que tôdas as espécies, exceto o *falciparum*, apresentam as várias fases de desenvolvimento no sangue periférico, em qualquer ocasião que se tire a amostra, e uma vez que seus gametocitos não persistem depois que as formas assexuadas desaparecem, é desnecessário mencionar a presença de trofozoítos, esquizontes e gametocitos, quando êstes podem ser indicados apenas com as letras V e M (para *vivax* e *malariae*).

Ao principiante, deve-se dar somente o melhor material de estudo possível, até que os diagnósticos das espécies sejam perfeitamente conhecidos. A qualidade das lâminas pode ser então gradualmente reduzida até atingir o nível da amostra de pior qualidade procedente do campo.

Qualquer tentativa de combinar os aspectos do esfregaço com diagnóstico de gôta espessa redundará em confusão e não deve ser permitida. A instrução deve ser contínua até que o estudante tenha completa confiança na gôta espessa sem a ajuda de outra base de diagnóstico. Para muitos, o exame minucioso de várias infecções é de grande valia, pois proporciona uma base sólida para compreender que os parasitos são dinâmicos, se desenvolvem e reagem ao meio como qualquer outro animal, podendo variar grandemente em aspecto, mas que o comportamento da infecção em conjunto tem características bem definidas.

18. EQUIPAMENTO

Necessidades mínimas: quantidade e qualidade, operação e manutenção

Para a montagem de um laboratório satisfatório, utilizar-se-ão, naturalmente, prédios, salas ou outros cômodos disponíveis. Na prática, muitas vezes se reserva espaço para trabalho entomológico de laboratório. Sempre que possível, o laboratório de diagnóstico

deve estar separado de tôdas as outras atividades, por causa da natureza do trabalho o porque é preferível um ambiente mais tranqüilo.

À medida que a prevalência da malária diminui, decresce também a quantidade de sangues positivos e isso arrefece o interêsse dos microscopistas, pois o trabalho se torna cada vez mais monótono. Dentro do possível, deve-se fazer tudo para o confôrto daqueles que estão empenhados nesse trabalho tão cansativo.

É essencial que o laboratório disponha de sala grande, bem ventilada e bem iluminada. Em localidades quentes e úmidas, um ventilador elétrico, preferivelmente colocado no fôrro, contribui para o sucesso dos trabalhos técnicos, além de proporcionar mais confôrto às pessoas que o executam. É desnecessário dizer que todo o local deve ser adequadamente telado. Enquanto êsse melhoramento não estiver instalado, cumpre proteger o material e instituir e obedecer rigorosamente tôdas as medidas de combate às môtas. Nos climas úmidos, deve-se providenciar desde o princípio um armário aquecido, de tamanho adequado para guardar, durante a noite, todos os microscópios em uso. Êsse armário deve ser equipado com lâmpadas elétricas ou qualquer outro sistema de aquecimento para manter uma temperatura constante, que não exceda 35°C. Isto evitará com eficiência o crescimento de fungos nas lentes e prismas.

As mesas e os bancos devem ser de construção sólida, grandes e suficientemente numerosos. As quinas das mesas devem ser arredondadas, a fim de proteger o antebraço das pessoas que trabalham com microscópios; sua superfície deve ser negra, sem brilho. A altura deve ser de 75 a 85 cm e a largura mínima de 80 cm; com estas especificações, será possível a utilização da maioria dos tipos de iluminadores.

Não é essencial nem desejável dispor de mobília especial de laboratório. Uma mesa de fabricação caseira, estável e sólida, com travessão cômodo para descanso dos pés, costuma ser preferível às mesas de microscopia desenhadas especialmente para uso de laboratório.

Além da mesa com travessão para os pés e *amplo espaço para os joelhos*, deve-se ter o cuidado de arranjar cadeiras, banquetas ou outros tipos de assento que possam ser ajustados à estatura da pessoa que os utiliza, tais como banquetas de piano ou cadeiras giratórias; podem-se usar também almofadas. A finalidade é proporcionar posição correta, de modo que o microscopista não

se canse mais depressa que o normal. Geralmente, êsse problema pode ser resolvido mediante a aquisição de banquetas de diferentes alturas.

É indispensável dispor de uma ou mais pias com água corrente, já que a limpeza das lâminas e de tôda a vidraria usada na coloração é de extrema importância. É aconselhável contar com um armário, prático, à prova de pó, para guardar a vidraria, vidros de corante e outros reativos, bem como arquivos de secretaria e registro.

Pode ser necessário uma pequena mesa, independente e firme, no caso de se dispor de uma balança de boa qualidade, afim de evitar danos resultantes de movimentos constantes.

Deve-se ter sempre água destilada em quantidade suficiente. Talvez seja necessário coletar água de chuva de maneira adequada e guardá-la em recipientes grandes de vidro. O moderno destilador elétrico produz em abundância água destilada de excelente qualidade. Os desmineralizadores (cartridge de ionizadores) produzem água destilada inteiramente adequada para a coloração de sangue, de maneira mais simples que o destilador.

Abaixo se apresenta lista de equipamento básico para um microscopista. A quantidade deve ser aumentada de acôrdo com o número dos mesmos.

Lista de material para um só microscopista

(Multiplicar pelo número de microscopistas e estudantes em trabalho.)

1 microscópio binocular, limpo, com oculares apropriadas ao fator de multiplicação dado para o seu corpo binocular, por exemplo:

<i>Fator</i>	<i>Ocular</i>
1,6x	4,5x
1,5x	5x
1,25x	6x
1x = nenhum fator	7x, 7,5x, 8x (máximo)

1 carro mecânico sólido e de fácil funcionamento.

1 protetor plástico contra o pó.

1 foco de luz abundante de côr branca ligeiramente azulada.

Iluminadores embutidos dotados de lâmpadas especiais transpa-

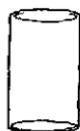
- rentes de menos de 25 watts de capacidade são inadequados. Deve haver filtros de vidro fôsko e filtros azuis tanto para o microscópio como para o foco de luz. A micro-lanterna "Chalet" da American Optical, sem filtros de vidro fôsko e azul, pode ser combinada com o frasco de Florence, cheio de água azulada e proporcionará excelente fonte de luz se fôr usada uma lâmpada "Chalet" comum, de 100 watts de vidro fôsko. A parte superior achatada da lanterna serve de fonte de calor para secar lâminas (A.H.T. No. 6958-E). Uma lâmpada de fabricação caseira proporciona os mesmos resultados (Diagrama 16, pág. 59).
- 1 unidade de aquecimento que dê uma temperatura até 35°C instalada em um armário para proteger os prismas e as lentes internas do microscópio contra o fungo nos climas quentes. Para êsse fim, deve-se dispor de um termômetro de máxima e mínima (ver Apêndice 20, pág. 114).
 - 1 pequeno frasco para óleo de imersão da mais baixa viscosidade, tipo Cargille A ou óleo Crown (em geral, os frascos de 20 cc dotados de bastão de vidro para retirar o óleo são melhores que os oferecidos pelas companhias de ótica).
 - 2 toalhas para vidraria que não soltem fibras em demasia, de 40 x 60 cm.
 - 4 cubas retangulares de coloração de 7 x 9 x 5 cm (ver Diagrama 17, pág. 69).
 - 2 lápis pretos macios (No. 1).
 - 1 pacote com 50 fôlhas de *papel cebola* da melhor qualidade de 11 x 21 cm (conservado entre papelão forte do mesmo tamanho).
 - 1 estilete pontegudo tipo "Bard-Parker," colocado em rôlha.
 - 1 folha de lixa 00 ou 000 para manter a ponta do estilete brilhante, limpa e afiada.
 - 1 pacote de gaze, um rôlo pequeno de gaze ou atadura e se não houver êsse material, um rôlo pequeno de algodão absorvente de boa qualidade (fibra longa).

Material para coloração:

- 1 relógio com divisão de 1 minuto até 2 horas, com campainha de repetição contínua até ser travada.
- 1 vidro de boca larga de 120 cc, com mistura de solução fosfatada de azul de metileno.

2 pequenos copos plásticos

de forma cilíndrica



e não cônica



para água tamponada para lavagem.

- 1 frasco de 30 cc (ou frasco conta-gotas plástico) cheio de corante Giemsa *bom*.
- 1 tubo graduado de 10-25 cc (de preferência plástico). (Tubos de ensaio com graduação de 5, 10, 15 cc também servem.)
- 1 placa recurvada de coloração ou equivalente, com depressão de 2-3 mm, ou uma cuba esmaltada retangular (ver Diagrama 12-D e E, pág. 46).
- 1 garrafa de vidro ou de plástico de 500, 750 ou 1.000 cc de capacidade.
- 1 garrafa com mistura de sais de fosfato na proporção previamente determinada, como, por exemplo, 4:5; e 6 tubos pequenos, com rôlhas, que possam conter 0,5, 0,75 ou 1,0 g dessa mistura.

Blocos para a secagem de lâminas de vários tamanhos, feitos com madeira dura, de boa qualidade, bem seca, com espessura de 2 a 2,5 cm. Os cortes transversais devem ter 7 mm de profundidade, com inclinação de 110° e ser separados 13 mm um do outro. Os cortes devem ser suficientemente largos—1,5 mm no mínimo—para comportar lâminas grossas. Um bloco de 2,5 x 20 cm comporta poucas lâminas, enquanto que um de 15 x 22 cm pode comportar 100 lâminas.

- 1 pacote de toalhas de papel.
- 1 caixa plástica para 25 lâminas, onde guardar gotas espessas para demonstração.
- 1 lâmina de barbear tipo "Gem".
- 2 fôlhas de papelão de embalagem comum (ondulado); vários artigos para transporte, secagem e embalagem de lâminas (barbante, papel de embrulho marron).

Artigos complementares para laboratório de zona ou central

- 1 objetiva de imersão em óleo, suplementar, e 10 pares de oculares 7x ou 7,5x, se forem usados microscópios destituídos de oculares intermediários.
- 1 objetiva demarcadora ajustável para marcar elementos microscópicos, uma para cada microscópio (ver Apêndice 16, pág. 108).
- 12-24 frascos de Florence de 250-300 cc.
- 1 teste pseudoisocromático-AO para visão das côres.
- 50 blocos de madeira de 1 cm e 2 cm de espessura, de 6 e 8 cm quadrado (25 de cada espessura).
- Rôlhas avulsas para todos os tipos de frascos.
- 36 frascos conta-gôtas plásticos (ver Apêndice 12, pág. 105).
- 1 frasco conta-gôtas de 30-60 cc para colocar tolueno puro, para cada três estudantes.
- 1 vasilha oblonga, esmaltada, de 35 x 25 x 8 cm, para cada três estudantes, ou 12 placas plásticas recurvadas.
- ½ litro de óleo Cargille ou Crown (da menor densidade).
- Giemsa—30 cc de solução mãe da mais alta qualidade, comprovada; ou 4 vidros de 5 g cada de um lote de pó de Giemsa comprovada, como, por exemplo, da National Aniline NGe 18.
- 3 vidros de 400 g de álcool metílico puro da melhor qualidade, livre de acetona.
- 1 quilo de glicerina pura, da melhor qualidade.
- 200 g de pérolas de vidro de 5 ou 6 mm de diâmetro.

Sais para água tamponada:

- 8 vidros de 100 g de Na_2HPO_4 , *anidro*.
- 400 g de pó fino ou cristais de KH_2PO_4 .
- 10 gramas de azul de metileno medicinal ou do melhor que houver.
- 1 frasco de 2 litros de capacidade, de polietileno se possível, contendo ácido crômico (bicromato de potássio e ácido sulfúrico).
- 1 funil esmaltado ou de vidro de 7,5 cm, para recolher na garrafa o ácido crômico das cubas retangulares de coloração.
- 3 litros de álcool a 90-95% para a limpeza de lâminas.
- Bacias esmaltadas ou plásticas para solução detergente para receber lâminas usadas.
- 1-2 baldes esmaltados ou plásticos.

APÊNDICES

**Os dez “pecados mortais”
na microscopia da gôta espessa**

1. POUCA NITIDEZ
2. ILUMINAÇÃO INADEQUADA
3. NÃO MOVER O PARAFUSO MICROMÉTRICO CONSTANTEMENTE
4. INICIAR O TRABALHO ENQUANTO OS LEUCOCITOS PARECEM MOVER-SE RADIALMENTE
5. NÃO FAMILIARIZAR-SE COM O ASPECTO DOS LEUCOCITOS, PLAQUETAS E GLÓBULOS VERMELHOS JOVENS, AZULADOS, JÁ QUE ÊSTES SÃO ENCONTRADOS EM CADA PREPARAÇÃO A SER EXAMINADA
6. PERDER TEMPO OBSERVANDO IMAGENS DUVIDOSAS OU CAMPOS MAL CORADOS
7. USAR O ESPELHO CÔNCAVO
8. USAR LÂMINAS, FRASCOS OU GARRAFAS SEM ETIQUETAS OU RÓTULOS DE IDENTIFICAÇÃO
9. NÃO PROTEGER CONTRA A ÁGUA, DE QUALQUER MANEIRA, AS SOLUÇÕES ALCOÓLICAS DE CORANTE
10. NÃO DEIXAR A OBJETIVA 10X NA POSIÇÃO DE TRABALHO, QUANDO TRANSPORTAR OU GUARDAR O MICROSCÓPIO

Antes, quando um sangue era dado como "positivo", a primeira pergunta que se fazia, era: "Qual a espécie?"; hoje, a pergunta é: "Quantos parasitos?", pois, se são numerosos, é muito mais provável ser certo o diagnóstico da espécie, ao passo que se o número de parasitos é escasso, o diagnóstico pode ser incerto, sendo em geral prolongado o reexame. Deve-se dar maior atenção as infecções com parasitos escassos, pois a descoberta de um único caso, em certa área, hoje, pode ser mais importante do que o encontro de 40 ou 100 casos 20 anos atrás.

O diagrama também tenta mostrar, pelo uso de abreviações, como podem ser registrados, de um modo simples e completo, todos os achados do sangue.

Apêndice 2

COMPORTAMENTO DOS GAMETOCITOS DE P. FALCIPARUM

CASO NO.	DIAS													SEMANAS							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	1	2	3	4	5	6	7	
1	154 _x	117 _x	7	1	0	0	-	-	-	-	-	0	-	-	1	128	43	8	2	0	-
2	137 _x	67 _x	34	0	0	0	-	-	0	-	-	-	-	-	0	14	25	7	2	0	0
3	59 _x	39 _x	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	98	228	48	4	30	0
4	62 _x	17 _x	24	5	1	-	-	-	0	-	-	-	-	-	82	372	84	12	2	15	0

CIFRAS = NÚMERO DE GAMETÓCITOS POR 100 CAMPOS DE GÔTA ESPÉSSA

Três a cinco semanas antes das observações acima, realizadas em 1949, quatro meninos tomaram quantidades desconhecidas de proguanil e quinino, provavelmente até que sua febre desaparecesse. O primeiro menino foi encontrado durante uma inspeção escolar de rotina e os outros foram localizados mais tarde, numa mesma família.

Cada uma das crianças recebeu 10 mg de isopentaquina nos dois primeiros dias, após ter sido retirada a amostra de sangue (indicado nas primeiras colunas pelos "x" minúsculos).

No 12º dia, o Caso No. 1 apresentou sintomas e raros anéis foram encontrados em seu sangue. O Caso No. 4 apresentou +F. No 13º dia, todos êles receberam quantidades adequadas de amodiaquina, em dose única.

Não foram vistos mais anéis nos 7 exames semanais subsequentes.

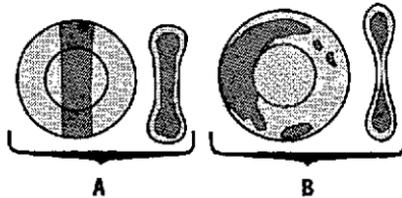
Por êste gráfico, deduzir-se-á que:

1. Os gametocitos raramente aparecem até a segunda semana de parasitemia;
2. Êles desaparecem espontâneamente depois de 5-7 semanas; ou
3. Êles desaparecem dentro de 72 horas após a ingestão de medicamento do tipo primaquina.

Pelo exposto, ver-se-á que em áreas de transmissão reduzida é mais importante dar quantidades adequadas de drogas esquizonticidas, no primeiro dia do tratamento, do que dar droga específica contra os gametocitos, mais tarde.

Apêndice 3

GLÓBULOS VERMELHOS EM FORMATO DE PNEUMÁTICO



A)-Hemácia normal, de frente e de perfil

B)-Hemácia nova ampliada, na qual a parte central é extremamente delgada. O parasito está representado como a parte central da hemácia em A) e ocupa somente a periferia em B).

A aparência contorcida dos parasitos bem desenvolvidos de *P. vivax* e *P. malariae*, devido ao tipo de célula em que se encontram, justifica uma palavra de explicação.

O diagrama esquemático acima tenta mostrar o tamanho e a forma, tanto de frente como de perfil, dos glóbulos vermelhos normais (A). A destruição de muitos glóbulos vermelhos, em consequência de repetidas esquizogonias, causa anemia que, ao se tornar mais acentuada, resulta no desenvolvimento incompleto de glóbulos vermelhos que chegam à circulação em números crescentes. Não raro, as células vermelhas, maiores que de costume (B), mostram acentuada constrição na parte central, em contraste com as células normais. Em vez de se assemelharem a discos bicôncavos espessos, lembram mais a câmaras de ar. Os glóbulos vermelhos jovens, azulados, são também encontrados em formatos similares.

Evidentemente, as membranas opostas da célula ficam tão juntas que a hemoglobina e outros componentes do sangue são forçados em direção à periferia. O aspecto resultante, que depende da quantidade de material do parasito presente, é mais ou menos o que está representado pela sombra em (B).

O estudante deverá entender que a distorção do parasito pelo formato da célula que o contém não representa comportamento característico do *P. vivax* ou do *P. malariae*.

Apêndice 4

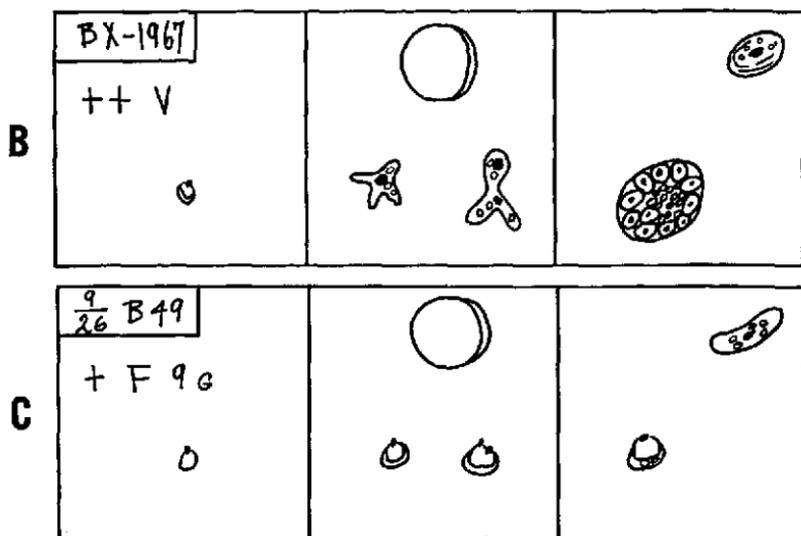
DIAGRAMA PARA O REGISTRO DE PARASITOS

A	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; width: fit-content; margin-bottom: 5px;">LÂMINA DE IDENTIFICAÇÃO</div> NO. APROX. PARASITOS ESPÉCIE	 TAMANHO DE LINFOCITO PEQUENO	
	O MENOR	2 MAIS NUMEROSOS	O MAIOR

O diagrama acima é usado para auxiliar o estudante a aprender as várias formas de desenvolvimento do parasito que possam estar presentes na mesma gôta espessa. Para uso do estudante, são fornecidos exemplares mimeografados (Diagrama A), sendo que para cada sangue desconhecido deve ser preenchido um desses exemplares, até que o estudante saiba representar o crescimento visto em cada lâmina de estudo examinada.

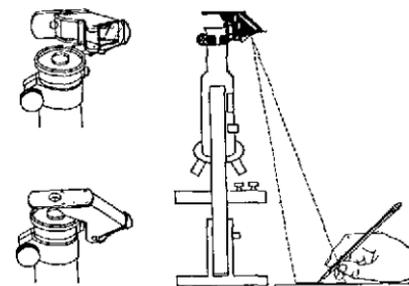
O exemplar mimeografado, de 18 x 5 cm, dividido em três partes iguais, contém um círculo de 8 mm de diâmetro, na porção superior do quadro central, representando o tamanho de um pequeno linfocito. A identificação da espécie é escrita no pequeno retângulo ao alto do primeiro quadro. Terminado o exame, coloca-se logo abaixo do retângulo o número aproximado de parasitos presentes e o diagnóstico da espécie.

O examinador move vagarosamente a gôta espessa—dependendo do número de parasitos presentes—até que 30 a 300 parasitos tenham sido inspecionados cuidadosamente. Então, após apagar a lâmpada do microscópio, desenha *de memória*, de modo esquemático e grosseiro, quatro esboços representando: (a) o menor parasito encontrado (no primeiro quadro); (b) dois exemplares da fase mais numerosa (no segundo quadro); (c) a maior das formas em crescimento vista (no terceiro quadro). Esboçar somente as formas assexuadas em crescimento. Se se desejar anotar a presença de gametocitos maduros, pode-se fazer um desenho em miniatura de um deles, no canto superior direito do terceiro quadro.



Definitivamente, NÃO é necessário fazer desenhos artísticos de parasitos individuais. Os parasitos devem ser cuidadosamente delineados em proporção ao círculo que representa o pequeno linfocito. Demonstrado o tamanho, representa-se a posição e a forma do fragmento ou fragmentos da cromatina. Dois ou três pequenos círculos podem ser colocados para representar a presença de pigmentos.

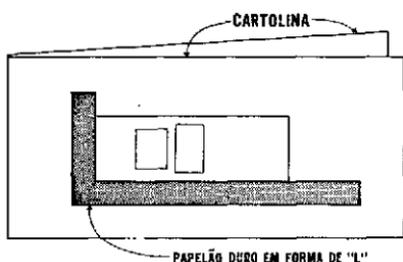
Para que o estudante possa adquirir certo conceito de tamanho no microscópio, deve-se-lhe dar oportunidade de ver pelo menos um sangue parasitado, em câmara lúcida. Esse aparelho, quando pròpriamente ajustado, projeta no papel, por meio de prismas, qualquer elemento visto no campo microscópico. É relativamente fácil traçar os contornos do pequeno linfocito e dos parasitos nas imediações.



Os Diagramas 6-8 (ver págs. 23, 25, 26) foram feitos dessa maneira.

Apêndice 5

MODELO



Os modelos ou padrões—por qualquer nome que sejam conhecidos—são indispensáveis para ensinar como fazer gôtas espessas boas e uniformes, além de uma faixa de sangue na qual é escrita a identificação com um lápis macio.

Uma pasta de cartolina comum, firme e forte é cortada na largura de 15,2 cms e depois recortada para fazer três pequenos pedaços de 9,5 cms x 15,2 cms cada um. Corta-se, de um papelão duro e forte—dos usados em fichários—um “L” medindo 4,5 cms no braço menor e 9 cms no braço maior, tendo cada braço a largura de 1 cm. O “L” é então colado a 2,5 cms da extremidade do papelão acima referido, como se vê na figura, e deixado secar bem.

Coloca-se, então, nesse “L”, uma lâmina de vidro e marcam-se os seus contornos externos com uma linha fina. A 2 cms da extremidade esquerda da lâmina, coloca-se uma linha vertical de 1,5 cm, equidistante dos bordos da lâmina. Dependendo do tamanho desejado para a gôta espessa forma-se um quadrado ou retângulo, como mostra o diagrama; e, 3 mm adiante, desenha-se um retângulo mais largo, consistente em tamanho com o número de letras ou números de identificação a serem empregados, ou bastante grande para conter as iniciais do paciente e a data.

Com êsses dois esboços claramente marcados, o principiante coloca uma lâmina limpa no ângulo do “L” e verifica onde o sangue deve tocar para ficar à esquerda do centro do retângulo, marcando

os limites da gôta espessa. Tanto quanto possa, com a amostra colhida, ele espalha então, rapidamente, o sangue dentro dos limites daquele desenho. A identificação é depois escrita na etiqueta de sangue.

Os esboços devem ser claros e vivos; não se trata de um desenho com o qual a lâmina final deva se parecer, mas de um esquema para se obter amostras uniformes na mesma posição na lâmina.

Apêndice 6

O FENÔMENO DA COLORAÇÃO DE SCHÜFFNER

Nos esfregaços de sangue bem corados de *P. vivax* e *P. ovale*, os glóbulos vermelhos parasitados apresentam grânulos avermelhados que se conhecem como granulação de Schüffner. Nas gôtas espessas, igualmente bem coradas, é freqüente ver-se ao redor do parasito um halo rosado do formato do glóbulo hospedeiro. Isso é conhecido como coloração de Schüffner, pois que os grânulos definidos raramente são distinguíveis, a menos que sejam corados com a técnica salina de Shute.

Nas gôtas espessas não se conhecem elementos semelhantes que acompanhem os parasitos de *P. malariae*.

Às vezes, vê-se no sangue parasitado pelos anéis de *falciparum* um halo rosado ou sombra do glóbulo vermelho hospedeiro. Essas gôtas espessas estão, em geral, mal coradas, isto é, a coloração foi excessiva, insuficiente ou irregular.

De qualquer forma, o diagnóstico é sempre baseado na agregação das formas em desenvolvimento que aparecem simultaneamente, e não na aparência do glóbulo corado.

Apêndice 7

TESTE RÁPIDO DA QUALIDADE DO CORANTE GIEMSA LÍQUIDO

Para êsse teste, tudo quanto se necessita é papel de filtro circular No. 2, de 10-12 cm, marca Whatman (usar o No. 1 se fôr o único encontrado) e um frasco conta-gôtas com álcool metílico puro.

Colocam-se no centro do papel de filtro uma ou duas gôtas da solução de Giemsa concentrada; e, em seguida, duas ou três gôtas de álcool metílico puro na mancha escura, que começa a se estender vagarosamente.

Disso resultam três círculos concêntricos de 5-7 cm, a saber:

1. Um círculo estreito externo, de côr vermelha ou rosa—eosina.
2. Um círculo central largo, de côr azul-violeta—azul de metileno.
3. Um círculo interno estreito, de côr azul-brilhante—azul de metileno.

Os corantes deteriorados nunca apresentam todos os três círculos.

Apêndice 8

TÉCNICA DA COLORAÇÃO SALINA DE SHUTE

En 1955, Shute, acidentalmente, diluiu certo corante Giemsa com solução salina normal (0,85%) para a coloração de esfregaços e ficou surpreso com a excelência da coloração dos parasitos, bem como da granulação, quando presente. Logo depois, obteve resultados semelhantes na gôta espessa.

O efeito desemoglobinizante é aparentemente muito mais drástico do que quando são usadas as soluções tamponadas; e a técnica parece dar melhores resultados com as lâminas que permanecem descoradas por longo período. Os glóbulos vermelhos jovens, azulados, não são tão proeminentes; os campos ficam em geral

mais limpos e os parasitos são mais facilmente localizados. A coloração, que dura 30 minutos ou mais, salienta a granulação de Schüffner de modo claro e distinto.

Aquêles que não estão familiarizados com êsse tipo de coloração deveriam investigar imediatamente as possibilidades de seu uso nas condições locais. Talvez se encontrem pequenas modificações para reduzir o tempo de coloração e a quantidade de Giemsa usada. Evidentemente, o princípio tem grandes vantagens.

As instruções dadas no livro* de Shute são as seguintes:

O corante é preparado nas seguintes proporções:

6 cc de corante Giemsa para cada 100 cc de NaCl [pH 7,0] a 0,85%.

Corar na posição invertida (de bôrco), em lotes de 25-50; ou em cubas de coloração, durante 30-60 minutos.

Lavar em água de torneira, escorrer e secar.

Usar o corante tantas vêzes quantas os resultados permitam.

Não é prático preparar porções sêcas de cloreto de sódio e sais para água tamponada, uma vez que dêstes últimos são necessárias quantidades muito pequenas. Foram obtidas as seguintes leituras de pH adicionando-se fosfato monodrógeno di-sódico a 1% a 500 cc de solução salina normal:

0,85 cc—7,2

0,65 cc—7,1

0,4 cc—7,0

Apêndice 9

COLORAÇÃO DO ESFREGAÇO DE SANGUE

Os esfregaços de sangue são bastante úteis para demonstrar os aspectos especiais dos parasitos da malária e das hemácias hospedeiras. Servem também para demonstrar hematologia anormal, parasitos na medula óssea, em pele esfoliada, em cortes cirúrgicos de placenta e cérebro, em baço e fígado. Qualquer dos dois métodos abaixo pode ser adequado para a coloração dêsses esfregaços:

* *Laboratory Technique for the Study of Malaria*. Percy G. Shute and Marjorie E. Maryon. J. and A. Churchill Ltd., London, 1960.

- A. Fixação com álcool metílico puro e coloração com corante Giemsa em água tamponada.
- B. Coloração com corante Wright ou Leishman diluído em água tamponada adequada.

O primeiro método é o mais comum, porém o último dá resultados hematológicos melhores.

Talvez seja necessário usar água tamponada especial na proporção de 3:5 a 5:5 em vez da proporção comum de 6:5 para se corar as granulações de Schüffner.

A água neutralizada é preparada adicionando-se 20 a 40 gotas de solução de fenol vermelho a 100-300 ml de água destilada. Adiciona-se carbonato de lítio (0,2%), gota a gota, até que se consiga uma cor rosa-violeta e esta permaneça depois de a solução ser bem agitada. A cor deve permanecer constante durante cerca de 20 minutos. Se ela desbota muito depressa, deve-se adicionar mais carbonato de lítio. O pH varia entre 6,6 e 7,4 e a cor que der bons resultados com certo lote de corante Wright é a desejada, independentemente de seu pH.

Método A

1. Fixar o esfregaço com álcool metílico puro.
2. Colocar as lâminas sobre bastões de vidro postos horizontalmente e separados 5 cm um do outro.
3. Cobrir as lâminas com corante Giemsa novo, preparado na base de 1 gota de Giemsa para cada cc de água tamponada a 4:5.
4. Corar durante 30-60 minutos.
5. Retirar o corante usando bastante água tamponada a 4:5.
6. Deixar escorrer ou retirar o excesso de água com papel absorvente.
7. Secar em calor brando.

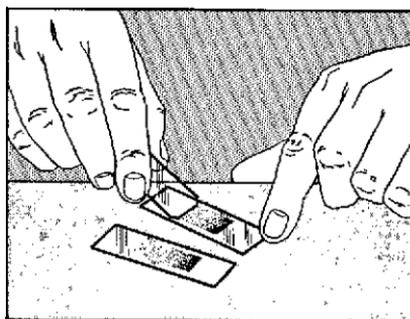
Método B

1. Colocar as lâminas sobre bastões de vidro postos horizontalmente.
2. Cobrir as lâminas com corante de Wright ou Leishman, puro.
3. Adicionar 1-2 volumes de água neutralizada.
4. Misturar com movimentos suaves dos bastões de vidro. Não soprar.

5. Retirar o corante depois de 20-30 minutos usando bastante quantidade do mesmo diluente.
6. Deixar escorrer ou retirar o excesso de água com papel absorvente.
7. Secar em calor brando.

Os glóbulos vermelhos corados com qualquer um desses dois métodos apresentam uma cor laranja-amarelado.

Quando é indicada a tomada de esfregaços, deve-se preferir a lâmina escantonada de Clay-Adams No. A-1463, para distender os mesmos (ver diagrama).



LÂMINAS COM AS MARGENS LIVRES

Apêndice 10

RECOLORAÇÃO DE GÔTAS ESPÊSSAS

Algumas gôtas espessas se decoram mais rapidamente que outras. Mesmo em preparações recém-coradas, aconselha-se o examinador a observar o bordo da gôta espessa para conseguir o melhor contraste de cor. O insucesso da tentativa de corar bem a parte central da gôta espessa pode muito bem ser devido ao secamento vagaroso daquela parte, por sua espessura ou por ser alta a umidade no lugar. A absorção de CO_2 do ar é contínua durante o tempo em que o sangue está úmido e pode ser uma das causas da falta da cor vermelha no centro de muitas gôtas espessas. Outros fatores, tais como limpeza das lâminas, qualidade do corante, água tamponada adequada e, em especial, a reação do meio de montagem, devem também ser considerados.

Lâminas individuais ou grupos de lâminas e até mesmo toda a coleção de lâminas de ensino têm-se tornado inúteis em três meses ou menos. Evidentemente, só Shute pode preparar gôtas espessas que às vezes duram decênios.

A recoloração nem sempre é satisfatória. Somente quando a coloração das preparações é excelente desde o princípio podem-se esperar bons resultados. Em geral, as gôtas espessas mais cuidadosamente protegidas contra a luz têm menor possibilidade de descoloração.

O princípio da recoloração baseia-se na coloração com soluções diluídas dos corantes, durante um tempo relativamente longo, usando-se a água tamponada com menos sal dibásico. Talvez seja necessário experimentar as águas tamponadas nas proporções de 3:5, 2:5, 1:5 e possivelmente 0,1% de fosfato de potássio, antes de se obter resultado satisfatório. Tem-se obtido considerável sucesso com um bom pó de Leishman preparado como o Giemsa (ver pág. 47), diluído na proporção de 1 gôta para 3-4 cc de água tamponada selecionada, deixando-se a preparação agir por tantos períodos de 10 minutos quantos forem necessários para que não se note mais nenhuma melhora na aparência microscópica. Se as lâminas forem colocadas, com a face voltada para cima, sobre bastões de vidro e cobertas com o corante diluído, observa-se que as partes da preparação que se encontram mais descoloradas ou muito vermelhas descoram o líquido corante exposto diretamente sobre elas, da mesma maneira como aparecem na gôta espessa. Deve-se adicionar corante novo e continuar a coloração até que nenhuma descoloração seja observada.

A descoloração dos esfregaços não é problema, visto que muitos deles conservam suas cores durante anos. Contudo, necessita-se de um método para recorar as áreas de campos especiais descolorados pelo uso durante horas em demonstrações.

Apêndice II

COLEÇÃO DE LÂMINAS PARA TREINAMENTO

Enquanto as infecções de malária são ainda bem numerosas, deveriam ser feitos planos com o fim de arquivar coleções de gôtas espessas coradas. Essas lâminas poderiam ser usadas no treina-

mento dos microscopistas atuais e, com o auxílio da recoloração, poderiam continuar a ser usadas para o treino de microscopistas que serão necessários durante a fase de vigilância de 3 anos.

Uma boa coleção de lâminas deve consistir em lotes de 10-25 gôtas espessas com 2 esfregaços do mesmo sangue tomado na mesma ocasião. Essas lâminas são identificadas de maneira a não revelar a espécie presente; são prontamente coradas e guardadas no escuro, em pacotes, até serem necessitadas. Uma semana antes do uso, sobre a mesmas devem ser aplicadas lâminulas limpas No. 1, montadas com uma das mais novas resinas dissolvida em xilol. O "euparal vert" retarda a descoloração mas é muito mais difícil de remover para a recoloração.

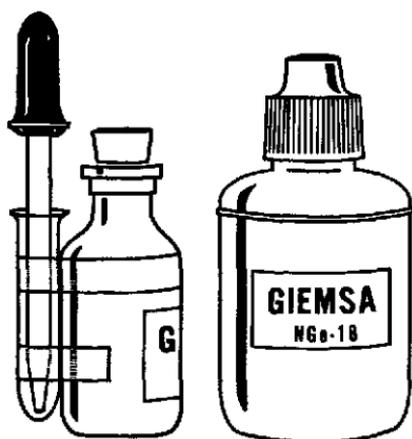
Devem ser feitos lotes de sangue contendo parasitos raros e também numerosos de cada uma das três fases do *P. falciparum*, bem como de lotes de sangue tomados em três diferentes ocasiões no ciclo do *P. vivax* e do *P. malariae*. Nos casos em que a droga anti-malárica ainda não tenha sido dada, pode-se, às vezes, adiar o tratamento por mais 24 horas para que se tenha tempo de retirar uma segunda gôta de sangue, para ser colocada ao lado da primeira. Devia-se incluir na coleção um lote de lâminas contendo sangue normal e outro de lâminas com sangue tirado logo depois que todos os parasitos tivessem desaparecido.

Podia-se entrar em acôrdo com hospitais e clínicas de pacientes externos movimentadas, bem como com inspetores e auxiliares de epidemiologia interessados, para a preparação de coleções de lâminas provenientes de enfermos nos quais o exame imediato do sangue revela um padrão de infecção ainda não incluído na coleção. É muito aconselhável fornecer para êsse fim pacotes de lâminas uniformes, novas e devidamente limpas.

Investigações ora em curso sobre o esmaecimento de lâminas conservadas para fins didáticos levam a crer que as gôtas espessas que foram bem coradas pelo método Field podem ser talvez usadas durante muitos meses antes de ser necessário abandoná-las por esmaecidas. Pelo menos uma parte dos lotes destinados a fins didáticos devia ser corada pelo método Field, além das que se preparam pelo método habitual de azul de metileno-Giemsa.

Apêndice 12

FRASCOS CONTA-GÔTAS PLÁSTICOS



Com os frascos conta-gôtas plásticos (variando de 30 a 150 cc de capacidade) agora disponíveis, o corante Giemsa fica melhor protegido contra a contaminação pela umidade do que em qualquer outro recipiente que necessite de uma pipeta separada para a retirada do número de gôtas apropriado.

Apêndice 13

LÁPIS PARA MARCAR NO SANGUE

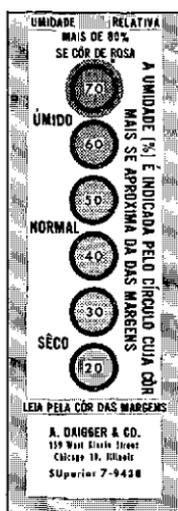
Embora o lápis No. 1 ou outros lápis de grafite macio sejam recomendados para escrever no sangue, tão logo este esteja sêco, o lápis "U.S. Dixon 2225 Film Mark" é excelente, pois não solta pó de grafite, que pode espalhar-se pelas partes adjacentes da gôta espessa.

Os lápis gordurosos (dermatográficos) devem ser evitados, uma vez que a marcação pode soltar-se durante o processo de coloração.

Além disso, se forem usados lápis gordurosos, azul ou vermelho, alguns pigmentos dessas cores podem permanecer na lâmina mesmo depois de removido o óleo.

Apêndice 14

“HUMIGRAPH”



O “Humigraph” é um cartão com 6 círculos pretos contendo material capaz de alterar sua cor do azul para o rosa e vice-versa. Suas margens são de cor acinzentada neutra com a qual é comparada a cor dos círculos.

A umidade é lida em percentagem, pelo número do círculo cuja cor se iguale à da margem. Caso um seja mais azul e o outro adjacente mais rosa, a leitura será feita pelo número mais baixo somado de 5.

O exterior do círculo 70 pode mudar a cor para rosa. Quando isso ocorre, a umidade é 80%+, o que vem interferir com a secagem rápida das gotas espessas.

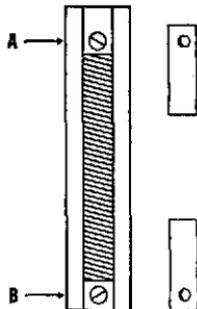
Apêndice 15

COMO AJUSTAR O PARAFUSO MACROMÉTRICO

Quando o ajuste macrométrico do microscópio começa a deslizar em virtude do peso do corpo binocular, a objetiva de imersão não fica em foco quando se retira a mão da cabeça do parafuso.

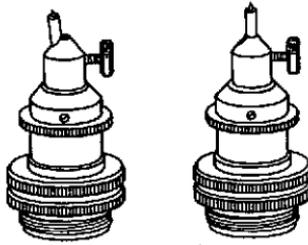
Em certos modelos de microscópios, o ajuste pode ser feito de maneira simples e imediata, girando-se as cabeças do parafuso macrométrico em sentidos opostos. Em outros, existem dois pequenos parafusos no alto do corpo do aparelho, logo acima do parafuso macrométrico, que poderão ser apertados com uma pequena chave de fenda, até que a tensão seja satisfatória.

Em outros microscópios, será necessário retirar a cremalheira, desapertar o parafuso A e B, e inserir camadas de fôlha de lata ou alumínio para controlar o deslizamento.



Apêndice 16

USO DA OBJETIVA DEMARCADORA



As objetivas demarcadoras, capazes de traçar um círculo tão pequeno quanto o campo microscópico, devem ser fornecidas, uma a cada microscopista ou pelo menos uma para cada três microscopistas trabalhando em conjunto. Podem economizar muito tempo na revisão, quando usadas corretamente. Os elementos duvidosos existentes na lâmina podem ser circundados para referência ao laboratório central, e êsse laboratório pode marcar elementos para serem enviados ao examinador original. A objetiva demarcadora é usada de modo rotineiro nas infecções com parasitos escassos.

Iniciada a busca de parasitos, o microscopista deve ter um registro do número de campos pesquisados. Se o examinador não encontrar parasito nos primeiros 25 campos, compreenderá que, se houver infecção, ela deverá conter bem poucos parasitos. Nem sempre é facil determinar as espécies—cada parasito localizado auxilia—quando os parasitos são em número diminuto.

O número do campo em que é encontrado o primeiro parasito deve ser marcado. O examinador, com os olhos fixos no parasito no centro do campo, verifica, em primeiro lugar, a firmeza com que a lâmina se adapta na platina mecânica. Se ela não estiver firme, deve fazer a correção da posição da lâmina sem perder de vista o elemento a demarcar. Finalmente, quando a lâmina está firmemente colocada, o examinador usa a objetiva demarcadora para circundar o elemento, primeiramente com o círculo menor, depois com um círculo bem maior para o fácil reconhecimento.

Se, por exemplo, o primeiro parasito fôr encontrado no 37° campo, e dois mais forem encontrados—um no 61° e o outro no 93° campo—os achados serão registrados assim: 37, 61, 93 §. Os três “o” colocados verticalmente após êsses números indicam que três parasitos foram circundados e que os círculos podem ser localizados com a objetiva 10x.

Uma vez encontrados três parasitos que mereçam fé, o examinador deverá encontrar suficientes parasitos para se certificar da espécie presente, independentemente do número de campos pesquisados. Se fôr impossível fazer um diagnóstico após o exame de 300 campos, em virtude de terem sido encontrados, por exemplo, apenas 7 parasitos, será permitido colocar após o diagnóstico mais provável uma interrogação; exemplo: F? ou escrever simplesmente 7 p/300 § F, dando assim ao revisor, uma idéia bem definida da frequência de parasitos. Em certa ocasião, quando foi marcado um parasito bem desenvolvido, examinaram-se mais 2.000 campos sem ser encontrado outro parasito.

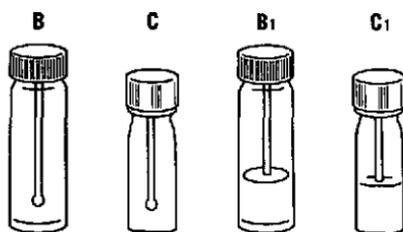
Apêndice 17

ÓLEO DE IMERSÃO



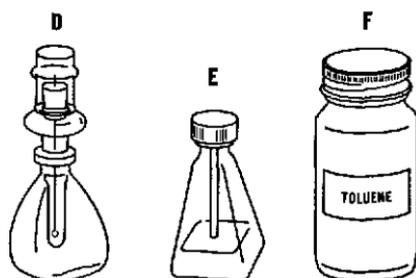
O pequeno desenho A representa um corte transversal de uma objetiva de imersão em óleo disposta de modo a mostrar que ela é composta de seis elementos de ótica diferentes. O que fica na abertura, do tamanho da cabeça de um alfinete, é o que mais freqüente e facilmente sofre dano por violência externa. Vê-se que essa pequena lente é esférica e tem uma distância focal curta. O aumento de 90-100x é tão grande que não se poderá obter nitidez apropriada, a menos que a superfície superior da lâmina com a amostra de sangue seja ligada à objetiva por meio de uma camada adequada de óleo com o mesmo índice de refração do vidro.

Os desenhos B e C mostram dois tipos de frascos para óleo de imersão dotados de bastão de vidro de ponta bulbosa, para melhor aplicar a quantidade desejada de óleo. Sendo essas pontas circundadas de ar, é possível vê-las claramente. Os desenhos B1 e C1 mostram como as pontas desaparecem quando imersas num óleo de índice de refração adequado.



Já que existem no mercado várias marcas de óleos de imersão sintéticos, não se deverá usar o tradicional óleo de cedro. Esse óleo torna-se viscoso bem depressa e seca feito verniz, envolvendo qualquer partícula de areia ou pó que venha a ter contacto com êle. Porisso, era êle o responsável pelo maior desgaste da parte inferior das platinas mecânicas. Em virtude de sua viscosidade, é muito difícil removê-lo da lâmina após o exame. O desenho D ilustra um velho tipo de frasco combinado para óleo e xilol, ainda em uso (o

frasco piramidal é ainda o melhor). O tubo estreito continha óleo de cedro, que era retirado por meio de um arame fino, recurvado na ponta; uma ou duas gotas de xilol eram retiradas do fundo desse tubo interno e postas em contacto com a objetiva, a fim de remover o óleo viscoso. Esse frasco dificultava o rápido manuseio das lâminas e foi, por isso mesmo, substituído pelos frascos tipos B e C, de boca larga rosqueada, e pelo frasco tipo F, que contém tolueno, fluido mais volátil, no qual as lâminas podem ser mergulhadas depois de retirada a maior parte do óleo com o auxílio de papel absorvente do tipo "Yes", ou qualquer outro equivalente.



Existem muitos óleos sintéticos modernos, como o "Crown", o "Mersol", etc., alguns dos quais conhecidos como óleos de cedro sintéticos, e também os óleos de "Cargille" e de "Shillaber", que vêm em duas densidades. Em geral, os óleos mais grossos diminuem a produção do trabalho. O Anizol ou Benzoato de Metila, solvente da gordura, tem sido usado como óleo de imersão, em virtude de seu índice de refração e de sua volatilidade. Esse solvente não descora as gotas espessas e não há objeção quanto ao seu odor. Pode ser experimentado, mas não é recomendado.

Pode-se preparar um bom óleo de imersão misturando-se:

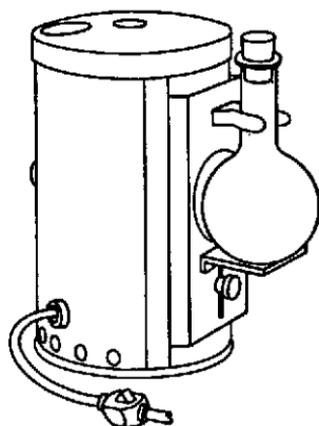
Petrolato líquido USP ou BP (pesado)	
ou Nujol	82 partes
1-bromonaphthalene	18 partes

O 1-bromonaphthalene poderá ser obtido da firma "Matheson, Coleman and Bell", East Rutherford, New Jersey, USA.

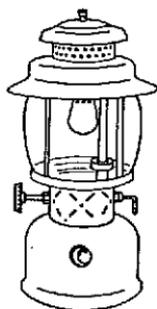
Para se remover qualquer resíduo de óleo que fique na lâmina depois de mergulhada em tolueno, coloca-se um pedaço de papel tipo "Yes" ao longo da gota espessa, enquanto esta estiver ainda úmida de tolueno.

Apêndice 18

TIPOS DE LÂMPADAS PARA MICROSCÓPIO



Lâmpada para microscópio no catálogo A.H.T., No. 6958-E.



Mostra a aparência dos tipos de lâmpadas de pressão que podem ser usadas em localidades onde não haja eletricidade. Têm capacidade de *250 velas ou menos*; o calor é intolerável com maior número de velas.

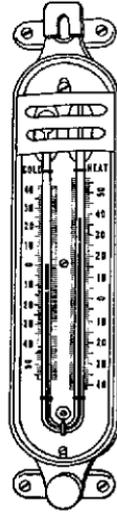
Apêndice 19
SERINGA DE BORRACHA



Esta seringa de borracha, para ouvido, de capacidade de 120 cc, pode produzir um forte jato de ar. É eficiente na remoção de fibras, fiapos de papel e poeira sêca que se tenha depositado na superfície das lentes e prismas.

Apêndice 20

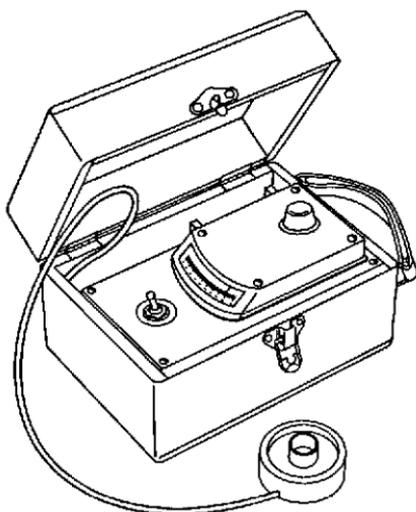
TERMÔMETRO DE MÁXIMA E MÍNIMA



A leitura do termômetro de máxima e mínima, é muito fácil. Os indicadores que mostram o ponto mais alto atingido pelas colunas de mercúrio podem ser postos em contacto com o mercúrio por meio de um pequeno imã, visto ao alto do termômetro.

Apêndice 21

FOTÔMETRO MARCA "PHOTOVOLT"



O modelo M-200 da "Photovolt Corporation", 95 Madison Ave., New York 16, N. Y., tem uma delicada célula fotoelétrica que, com o ponteiro colocado em HI, registra frações de 1 pé/vela, numa escala de 100 divisões, que é igual a 2 pés/vela. A leitura pode ser feita em pés/velas, ou mais simplesmente em números de divisões indicados pela agulha. Seria vantajoso centrar o "zero" do aparelho no 20 ou 30 da escala, área onde a agulha oscila com mais facilidade. Um dispositivo especial, que se adapta em qualquer ocular, permite medir a luz ao nível dos olhos. Tais leituras têm em média 1 divisão mais baixa do que quando não é usado o dispositivo.

A quantidade de luz num microscópio binocular, estabelecida pela maioria dos microscopistas, varia de 1,5 a 4 divisões. É possível, geralmente, melhorar a leitura de 4 divisões pelo ajustamento adequado de todos os fatores envolvidos.

Invariavelmente, os estudantes se esforçam para conseguir uma leitura numérica mais alta que a do seu vizinho. Ao conseguir isso, eles melhoram sua própria iluminação.

Apêndice 22

REVISÃO CONTÍNUA DO EQUIPAMENTO MICROSCÓPICO

A experiência tem demonstrado que o meio de manter um alto grau de limpeza dos microscópios em qualquer campanha de malária, em qualquer país, é fazer uma inspeção contínua dos mesmos cada dois ou três meses, por pessoa *competente*.

Essa pessoa deve ter, antes de tudo, interesse tanto pela microscopia como pelas gôtas espessas. Além disso, deve estar equipada com o seguinte material:

Uma objetiva de imersão, suplementar, em perfeitas condições para comparação com as objetivas de imersão sob inspeção.

Uma coleção selecionada de gôtas espessas bem feitas e bem coradas para serem usadas como teste e demonstração.

Vários pares de oculares 5x, 6x, etc., para proporcionar um aumento de 6-800x nas diferentes marcas de microscópios em uso naquela área.

1 lupa de 5x.

1 seringa de borracha de 120 cc de capacidade.

1 tubo de vaselina.

2 folhas de lixa No. 00 ou 000.

1 jogo de chaves de fenda de diferentes tamanhos.

1 jogo de chaves de fenda bem pequenas, do tipo de relojoeiro.

1 alicate pequeno, de preferência pontudo.

50 gramas de algodão absorvente de boa qualidade.

24 palitos de madeira.

1 fotômetro "Photovolt" (útil mas não indispensável).

Apêndice 23

DEFINIÇÕES

<i>Trofozoítos</i>	Todos os parasitos não divididos. Os trofozoítos mais jovens são chamados “anéis”.
<i>Esquizontes</i>	Tôdas as formas assexuadas <i>adultas</i> com duas ou mais divisões do núcleo.
<i>Esquizontes maduros</i>	São os esquizontes em que os merozoítos estão completamente formados.
<i>Merozoítos</i>	Resultam da segmentação do esquizonte do fígado ou do esquizonte eritrocítico. Podem-se encontrar separados do esquizonte original ou contidos neste.
<i>Fase eritrocítica</i>	Qualquer fase do parasito dentro dos glóbulos vermelhos.
<i>Fase exoeritrocítica</i>	Fases no fígado do homem. Pré-eritrocítica, quando derivados de esporozoítos (a única fase formada nas infecções <i>P. falciparum</i>); exoeritrocítica, se derivada de outras fases hepáticas.
<i>Gametocitos</i>	Formas sexuadas que se desenvolvem e atingem a maturidade em um único glóbulo vermelho. Os gametocitos de <i>P. falciparum</i> são, às vêzes, chamados “bananas” ou “crescentes”.
<i>Esporozoítos</i>	Formas infectantes para o homem, resultantes da divisão final do oocisto no mosquito.
<i>Oocisto</i>	Desenvolve-se do gameto fertilizado, entre as células de revestimento do estômago do mosquito.
<i>Hematina</i>	Pigmento encontrado em tôdas as formas de parasitos, menos nas fases iniciais; pode ser também chamado de hemozoina.

DEFINIÇÕES (cont.)

<i>Cromatina</i>	Parte nuclear do parasito corada em vermelho.
<i>Citoplasma</i>	Protoplasma do parasito corado em azul.
<i>Período de incubação</i>	Período que vai entre a picada infectante do mosquito e o aparecimento de parasitos ou sintomas. Nêsse período está incluída a duração de fase pré-eritrocítica, mais o número de dias necessários para que os parasitos alcancem níveis microscópicos ou sejam capazes de causar sintomas.
<i>Paroxismos</i>	Manifestações cíclicas da malária aguda que se seguem à esquizogonia de um número elevado de parasitos de qualquer espécie. As mais comuns são o calafrio e febre. Um paroxismo pode durar de $\frac{1}{2}$ a 18 horas.
<i>Acesso</i>	Pode incluir um ou vários paroxismos e pode terminar espontâneamente ou após a administração de medicamento; pode durar de um a muitos dias.
<i>Anemia</i>	Perda de glóbulos vermelhos por qualquer causa. Na malária, resulta da rutura dos esquizontes maduros na ocasião de cada esquizogonia. O aumento crescente dos elementos eritrocíticos corados em azul na gôta espêssa foi primeiramente notado por Barber como indicação de anemia.
