

DIAGNÓSTICO DA AMEBÍASE INTESTINAL PELO EXAME COPROLÓGICO

Mauro Pereira BARRETTO

RESUMO

O autor faz uma análise crítica detalhada dos métodos de colheita, conservação e exame de fezes para o diagnóstico da amebíase intestinal e, baseado em sua experiência, sugere normas a serem seguidas e métodos a serem adotados nos laboratórios hospitalares, particulares e dos Serviços de Saúde Pública, assim como nos inquéritos epidemiológicos.

INTRODUÇÃO

Pode parecer estranho que, diante da existência de diversos trabalhos mais ou menos recentes sobre o assunto, tanto na literatura estrangeira^{9, 35, 56, 57, 107, 122, 126, 142}, quanto na nacional^{3, 4, 87}, venhamos abordar o problema do diagnóstico da amebíase pelo exame coprológico. Acontece, porém, que estes trabalhos ou tratam do problema de modo parcial, ou trazem apenas a experiência pessoal do autor, ou ainda aconselham o uso de métodos e técnicas que já se acham superados. Por isto, resolvemos fazer uma revisão do assunto, discutindo o valor dos métodos de colheita, conservação e exame de material que, nestes últimos anos, têm sido mais aconselhados e empregados e que têm sido extensivamente experimentados em nosso Departamento.

Parece desnecessário insistir sobre a importância do encontro do parasito para um diagnóstico seguro da amebíase. Alguns métodos indiretos, principalmente reações sorológicas, têm sido propostos, mas, até o presente estas reações são de importância prática muito discutível^{3, 9, 35, 41, 53, 89, 127}.

Apenas nos casos em que a demonstração do parasito é impossível, como nas localizações extra-intestinais da *E. histolytica*, que aliás devem ser consideradas como compli-

cações da amebíase, as reações sorológicas, particularmente a de fixação do complemento, podem ter algum valor^{54, 70, 73, 82, 93, 129} e podem ser consideradas como métodos coadjuvantes do diagnóstico clínico. Mas, o diagnóstico da amebíase intestinal depende inteiramente da demonstração microscópica e da identificação correta do agente causal.

Para isto, além de equipamento apropriado e pessoal competente, cuidados especiais se fazem necessários na colheita e conservação adequada do material e na escolha de métodos eficientes de pesquisa do parasito.

I. COLHEITA DO MATERIAL

1. *Fezes emitidas espontaneamente* — De um modo geral, as fezes eliminadas naturalmente pelo paciente, quer sejam disentericas, diarréicas, pastosas ou formadas, permitem o diagnóstico da grande maioria dos casos de amebíase, desde que sejam adequadamente colhidas e conservadas.

2. *Fezes obtidas mediante purgativo* — Diversos autores têm verificado que a administração de um purgativo aumenta consideravelmente a positividade dos exames de fezes para a pesquisa da *E. histolytica*. As-

sim, MAGATH⁹⁵ mostrou que apenas um terço dos casos positivos era evidenciado pelo exame de uma única amostra de fezes normalmente emitidas pelos pacientes; após administração de um purgativo de sulfato de magnésio, 75% das infecções eram diagnosticadas. As verificações de ANDREWS¹⁰ são ainda mais sugestivas, pois mostram que 88,9% dos casos são positivados por um exame de fezes obtidas mediante uso de purgativo. Tal uso é recomendado por vários autores^{30, 69, 124}. Em trabalho anterior¹⁶ confirmamos a superioridade do exame de material obtido mediante purgativo sobre o de fezes eliminadas espontaneamente e mostramos que a superioridade se deve ao aparecimento de trofozoítas em número maior de casos. Usando esfregaços corados pela hematoxilina férrica, obtivemos 50,6% de positividade em fezes normalmente passadas e 76,5% de positividade em material obtido mediante catártico; as proporções de casos positivos para trofozoítas foram, respectivamente, de 20,0% e 72,9%. A freqüência de cistos diminui, porém, no material obtido mediante purgativo, quer a pesquisa seja feita pelo exame de esfregaços, quer por métodos de concentração.

O uso de catártico aumenta a freqüência de trofozoítas nas fezes porque promove a eliminação destas formas presentes na luz das partes mais altas do intestino e daquelas situadas no interior das lesões, isto em virtude da ação estimuladora do peristaltismo e descamativa da mucosa.

A administração de purgativo tem, porém, algumas desvantagens: a) altera a morfologia dos trofozoítas, ainda que todos os cuidados sejam tomados para a conservação e exame do material; b) representa um inconveniente para o paciente, resultante do desconforto, como assinalam AMARAL & PIRES⁷, e é mesmo contra-indicada em muitos casos de colites, apendicites, pirexias, etc.; c) requer cuidados especiais com as fezes: ou o doente deve vir evacuar no laboratório (quando não internado) ou êle próprio deve cuidar de fixar o material, o que nem sempre é viável.

Dos purgativos mais comumente usados, os oleosos e a magnésia são formalmente contra-indicados^{4, 9, 11, 34, 35}; isto porque tor-

nam as fezes impróprias para exame principalmente pelos métodos de concentração. O sulfato de magnésio também não deve ser usado dada sua ação alcalinizante forte. O mais indicado segundo os autores que têm experiência no assunto^{4, 35, 56} e sobre o qual recai a nossa escolha é o sulfato de sódio que provoca menor alteração dos trofozoítas. D'ANTONI⁵¹, CRAIG & FAUST⁴⁷, FAUST & RUSSELL⁵⁹, BROOKE³⁵ e outros aconselham também a solução-tampão fosfo-sódica.

Ao fazer uso de purgativo o paciente deverá, sempre que possível, colher separadamente as evacuações sucessivas, para exame.

3. *Fezes obtidas por enema* — Tal procedimento é aconselhado por D'ANTONI^{50, 51}, FAUST⁵⁶ e outros. Deve-se preferir um enema de retenção alta, com solução fisiológica aquecida. As fezes formadas ou semi-sólidas obtidas na primeira evacuação devem ser colhidas separadamente da parte líquida.

O uso de enema aumenta a freqüência de trofozoítas nas fezes, como demonstramos em trabalho anterior¹⁴. Em esfregaços corados pela hematoxilina obtivemos 52,2% de positividade para o material colhido por enema contra 20,0% para fezes normalmente passadas: a freqüência de trofozoítas é, porém, bem menor que no material obtido por purgativo. Por outro lado, no material obtido por enema os trofozoítas apresentam-se mais bem conservados.

Mas o uso de enema representa uma grande complicação. Só em casos excepcionais, naqueles em que o uso de purgativo é contra-indicado, deve-se a êle recorrer.

4. *Material obtido por retossigmoidoscopia* — Muito se tem discutido a respeito do valor da retossigmoidoscopia^{18, 19}.

Analisando seu valor como método de colheita de material para exame parasitológico, devemos distinguir dois grupos de casos: aquêles em que se visa obter fezes e aquêles em que se deseja colher exsudato ou material de lesões eventualmente presentes nas últimas porções do tubo digestivo.

Como método de colheita de fezes ela é indicada principalmente nos doentes mentais, cuja cooperação não se consegue obter ou nos quais não se pode confiar. GOLDEN-

BERG & col.⁶⁴ a recomendam também para a colheita de fezes de crianças pequenas. Neste caso o paciente não deve ter feito uso de purgativo ou recebido enema. As fezes eventualmente presentes no reto são colhidas com uma concha de tamanho apropriado.

Quando se deseja colher exsudato presente no reto o paciente deve ter previamente esvaziado o intestino ou espontaneamente ou mediante purgativo, como sugere BROOKE³⁵. Para a colheita usa-se uma pipeta munida de pêra de borracha. O uso de "swab" é condenado.

Para a visualização de lesões e colheita de material, o paciente deve ser previamente submetido a uma lavagem intestinal. Após limpeza da lesão ou área suspeita com gaze cirúrgica, o material é colhido com uma cureta de Volkman como aconselham BARRETTO & SILVA¹⁸. Desaconselhamos a biopsia recomendada por JACKMAN & COOPER⁷⁴, MANSON-BAHR & MUGGLETON⁹⁶, JUNIPER & col.⁸⁰, porque há perigo de hemorragia e o exame do material é dificultado pelo grande número de células.

A retossigmoidoscopia tem vários inconvenientes, entre os quais o de requerer aparelhagem especial e o concurso de especialista ou de laboratorista especialmente treinado, e o de não ser bem recebida pelo paciente. As fezes colhidas dão os mesmos resultados que as espontaneamente eliminadas, e, a não ser em psicopatas e crianças, como já assinalamos, a colheita de fezes por retossigmoidoscopia não se justifica. O exame de exsudatos e particularmente do material curetado dá resultados muito inferiores aos fornecidos pelo exame de fezes por processos adequados, nos casos de amebíase crônica, como mostram BARRETTO & SILVA¹⁹, isto porque apenas uma certa percentagem de amebianos tem lesões nos segmentos do intestino acessíveis ao retossigmoidoscópio. Nos casos de diarréia ou disenteria, o exame de fezes por processos adequados dá resultados iguais ou superiores, se bem que possa falhar em alguns casos.

Assim sendo, a colheita de material por retossigmoidoscopia só tem indicação em casos particulares.

II. CONSERVAÇÃO DO MATERIAL

1. *Material não fixado* — Uma vez colhido, o material deve ser imediatamente examinado ou, se isto não é possível, deve ser conservado de tal modo a impedir deterioração.

O ideal, como assinala BROOKE³⁵, seria examiná-lo logo após a colheita. Isto porque os trofozoítas se deterioram rapidamente. Segundo AMARAL³, o diagnóstico dos trofozoítas vivos no exame a fresco só pode ser feito, na generalidade dos casos, dentro de 15 minutos.

Sendo a *E. histolytica* parasito de um hospedeiro homeotermo e só se cultivando bem a 37°C, parece que seria lógico conservar o material aquecido, quando o exame não pode ser feito imediatamente. É o que faziam os autores antigos e é o que recomendam ainda LIMA & BARANSKI⁸⁷, LONDERO⁹⁰ e outros. Todavia, TSUCHIYA¹³², GOREVITCH & DELIGHTISH⁶⁸ e outros mostram que a conservação de fezes aquecidas apressa a morte dos trofozoítas. TSUCHIYA¹³² demonstrou, por culturas, que os trofozoítas nas fezes sobrevivem durante 48 a 96 horas quando elas são conservadas na geladeira a 5°C; na estufa a 37°C êles se tornam inviáveis 2-5 horas depois. Isto parece ser devido à multiplicação de bactérias e à putrefação das fezes. Assim sendo, quando o material não pode ser examinado logo depois de colhido, deve ser conservado à temperatura ambiente ou de preferência na geladeira, por algumas horas apenas.

Mas, mesmo conservados na geladeira, os trofozoítas que se imobilizaram não readquirem seus movimentos típicos, quando aquecidos durante o exame, e o diagnóstico se torna impossível ao exame a fresco. Êles acabam por sofrer modificações morfológicas que tornam mais difícil o diagnóstico, mesmo nos preparados corados. Como assinala BROOKE³⁵, nos casos de disenteria, se as fezes não são logo recebidas pelo laboratório, os trofozoítas se mostram geralmente irreconhecíveis ou completamente desintegrados no momento do exame. Se a demora é grande, até os cistos acabam por se deteriorar. Daí a necessidade da fixação do material.

2. *Fixação do material* — Diversos têm sido os fixadores recomendados para a conservação de trofozoítas ou cistos nas fezes, exsudatos, etc.

a. *Formol*. O uso do formol a 5 ou 10% como fixador tem sido recomendado por CUNHA⁴⁸, ROSENFELD¹¹⁴, AMARAL², RITCHIE³⁵, JOHNSON & EBBESEN⁷⁹ e outros. A solução de formol conserva bem os cistos, que permanecem diagnosticáveis por muitos dias, nas preparações coradas pelo Lugol. Sendo necessário resolver dúvidas, os cistos fixados podem ser corados pela hematoxilina férrica, segundo a técnica de JESKA & GENTZKOW⁷⁸.

Todavia os cistos conservados em formol, depois de sete dias não flutuam bem no sulfato de zinco e, assim, as fezes se tornam impróprias para o uso do método de Faust e col., que é o mais eficiente, como veremos. A maior desvantagem do formol reside, porém, na não conservação de trofozoítas e, assim, não pode ser usado para fixação de fezes disentericas, diarréicas ou obtidas por purgativo, e de exsudatos e material colhido durante retossigmoidoscopia.

b. *Álcool polivinílico (P.V.A.)*. Preconizado por GOLDMAN^{65, 66} para a confecção de esfregaços de fezes, o álcool polivinílico misturado ao líquido de Schaudinn foi recomendado para a fixação e conservação de fezes por BROOKE & GOLDMAN³⁷.

A utilidade dêste fixador para a conservação de protozoários intestinais, particularmente para trofozoítas, tem sido posta em relêvo por diversos pesquisadores^{12, 35, 38, 39, 42, 67, 71, 72, 76, 81, 87, 97, 103, 106, 108, 142}. Segundo BROOKES³⁵ os trofozoítas conservam-se em condições satisfatórias para a coloração e identificação durante vários meses.

Em nossas mãos o álcool polivinílico, só ou associado ao líquido de Schaudinn, não tem dado resultados satisfatórios^{14, 18}. A coloração do material pela hematoxilina férrica ou molíbdica é grosseira e irregular, tornando-se difícil, em muitos casos, a distinção entre a *E. histolytica* e a *E. coli*.

Por outro lado, o material fixado em álcool polivinílico não se presta para ser sub-

metido aos métodos de concentração, indispensáveis para a pesquisa de cistos.

c. *Solução de mertiolato-iôdo-formol (M. I.F.)*. SAPERO & col.^{116, 117} introduziram uma solução aquosa de mertiolato, formol e glicerina, à qual se junta o lugol no momento de usar, para a conservação e coloração de protozoários nas fezes. Êste fixador tem sido recomendado por vários pesquisadores^{32, 35, 71, 72, 90, 91, 92, 101}.

Como assinala COUTINHO⁴³, além do alto custo do mertiolato, êste fixador tem a desvantagem de requerer a adição do lugol no momento de usar, dada a instabilidade da mistura. Para obviar êste inconveniente alguns autores recomendam fixar as fezes apenas em mertiolato-formol-glicerina e só juntar o lugol no momento do exame. Mas há outros inconvenientes maiores. A despeito do que afirmam alguns autores, o MIF não conserva bem os trofozoítas, que não são identificáveis com segurança no exame direto, e, o que é mais importante, o material nêle fixado não se presta para coloração pela hematoxilina férrica, muitas vezes indispensável para a identificação do parasito. Finalmente, êste material fixado embora possa ser submetido ao enriquecimento pelo método de BLACC & col.³², não se presta para a concentração pela centrifugo-flutuação no sulfato de zinco, que é, como veremos, o melhor método.

COUTINHO⁴³ substituiu o mertiolato pelo mercúrio-cromo, o que assegura maior estabilidade do fixador. As fezes são fixadas na solução de mercúrio-cromo, formol e glicerina e o lugol é adicionado no momento do exame.

Experimentando largamente esta técnica, assim como a precedente, verificamos que os cistos se conservam bem durante vários meses. Mas os trofozoítas se alteram. Por outro lado, se as fezes podem ser concentradas pelo método de BLACC & col.³², elas não se prestam para a concentração pela centrifugo-flutuação no sulfato de zinco.

Em resumo, tanto o MIF original, quanto o fixador proposto por COUTINHO⁴³, em nossas mãos, não deram resultados superiores ao formol a 5-10% que é mais simples e econômico.

d. *Fixador de Basnuevo e Figares.* BASNUEVO & FIGARES^{25, 26} desenvolveram um fixador constituído de azul de metileno, álcool, fenol, formol e água, nos quais cistos e trofozoítas se conservariam bem.

Experimentamos êste fixador em material obtido por retossigmoidoscopia e verificamos que a conservação de trofozoítas é extremamente precária¹⁸. Por outro lado, o material fixado não se presta para ser submetido às técnicas de concentração.

e. *Líquidos de Schaudinn e Gilson.* Para a fixação e conservação de fezes AMARAL & MAYRINK⁵, revivendo a técnica de fixação em massa, utilizada sobretudo no estudo dos ciliados parasitos e de vida-livre e também recomendada por LANGERON⁸⁵ para os amebídeos, propuseram o líquido de Schaudinn. O líquido de Schaudinn pode ser diluído ao meio, como aconselha WENRICH¹³⁵ e confirma BARRETTO¹⁵ e pode ser substituído também pelo Gilson ou pelo Bouin-Hollande^{14, 15}.

Êstes fixadores têm a vantagem de conservar perfeitos os cistos e trofozoítas e permitir a coloração pela hematoxilina férrica, sempre que isto se tornar necessário. Neste particular é muito superior ao álcool polivinílico só ou associado ao líquido de Schaudinn.

O material fixado não se presta, porém, para a coloração pelo lugol nas preparações não permanentes usadas para a pesquisa de cistos e, o que é mais importante, não dá boa concentração pela centrífugo-flutuação no sulfato de zinco.

3. *Orientação a seguir* — Desde que os trofozoítas degeneram rapidamente, tornando o diagnóstico difícil senão impossível, se o exame não pode ser feito imediatamente, as fezes devem ser fixadas e os fixadores de escolha são os líquidos de Schaudinn (puro ou diluído ao meio) ou de Gilson.

Visto que os cistos se conservam bem, principalmente quando as fezes são mantidas em geladeira, não há necessidade de fixação da porção de fezes destinada à pesquisa daqueles elementos. Se, porém, o exame deve ser feito alguns dias após a colheita, como acontece durante inquéritos epide-

miológicos em comunidades afastadas, as fezes devem ser fixadas e o fixador de escolha é o formol a 5 ou 10%.

No caso particular de exsudato ou material raspado de lesão durante retossigmoidoscopia, geralmente em pequena quantidade, esfregaços devem ser confeccionados e fixados imediatamente em Schaudinn, Bouin-Hollande ou Gilson¹⁸.

III. MÉTODOS DE EXAME

Deixando de parte a inoculação em animais, só praticável nos trabalhos experimentais, a pesquisa da *E. histolytica* pode ser feita pelo exame direto do material ou em culturas.

1. *Culturas* — Desde os trabalhos de BOECK & DRBOHLAV³³, inúmeros têm sido os autores que preconizam as culturas como método de diagnóstico da *E. histolytica* e muitos têm sido os meios propostos.

O valor do método é muito discutido, pois os resultados obtidos não são concordantes; enquanto alguns consideram-no superior ao exame das fezes, outros têm opinião contrária. Para não nos alongarmos, remetemos o leitor ao trabalho de AMARAL³ que analisa exaustivamente o assunto.

Em nossas investigações sobre a amebíase temos verificado que o cultivo da *E. histolytica*, a partir de cistos previamente concentrados e tratados para eliminar contaminação excessiva, é relativamente fácil^{17, 18}. O mesmo não se dá quando no material só existem trofozoítas; nestas condições, apesar de todos os cuidados, as culturas falham com freqüência, mesmo quando partimos de material rico e fresco¹⁸.

Embora não tenhamos feito um estudo comparativo sistematizado a respeito, a nossa experiência de vários anos nos autoriza a concluir que as culturas dão resultados inferiores ao exame de fezes por processos adequados. Neste particular estamos inteiramente de acôrdo com AMARAL⁴. Julgamos que a superioridade das culturas, alegada por vários autores, se deve ao fato de os exames de fezes não serem feitos pelos processos mais indicados. Além disto, as cul-

turas oferecem outros inconvenientes: o método é laborioso e demorado e o diagnóstico específico pelo exame a fresco do sedimento das culturas é incerto, sendo necessário que recorramos à coloração^{3, 35, 141}. Mesmo nos esfregaços corados muitas vezes o diagnóstico diferencial entre a *E. histolytica* e a *E. coli* ou a *E. hartmanni* é difícil como já assinalara YOUNG¹⁴¹.

Segundo AMARAL³, as culturas seriam indicadas, como processo de exceção, nos casos em que os métodos adequados de concentração revelam cistos pouco numerosos, cujos caracteres (estrutura e dimensões) não permitem diagnóstico. Nossa experiência neste particular não nos autoriza a concordar com o autor citado. Preferimos em tais casos repetir o exame de fezes.

AMARAL³, BROOKE³⁵ e outros julgam que as culturas podem ser de valor no diagnóstico dos trofozoítas em vias de degeneração, mas ainda viáveis, como acontece no material obtido por purgativo. Mas, se é difícil o cultivo de trofozoítas frescos e intactos, obtidos pelo raspado de lesões, como mostraram BARRETTO & SILVA¹⁸, muito mais difícil é a obtenção de culturas a partir de trofozoítas em degeneração.

Em conclusão, as culturas não constituem métodos de pesquisa da *E. histolytica* nas fezes, particularmente na rotina dos laboratórios, mesmo em casos de exceção. É claro que em alguns casos em que a pesquisa de trofozoítas ou cistos nas fezes falha, as culturas podem dar resultados positivos. Mas a manutenção de requisitos necessários e adequados a este método de exame em um ou outro caso não se justifica. É preferível repetir o exame de fezes.

2. *Pesquisa do parasito no material suspeito* — Do que acabamos de dizer conclui-se que o diagnóstico da amebíase intestinal repousa no encontro do parasito nas fezes ou exsudatos. A pesquisa dos trofozoítas e cistos pode ser feita diretamente no material não submetido a processos de enriquecimento; mas é necessário sempre complementar o exame com os métodos de concentração.

A. *Métodos de exame sem enriquecimento*. Estes métodos são os únicos utilizáveis

para a pesquisa de trofozoítas, se bem que os cistos possam também ser por eles pesquisados.

a. *Preparações não permanentes*. Estas preparações são as mais simples de obter, as que requerem um mínimo de equipamento e as que conduzem a um resultado mais rápido. Entretanto, como veremos, não são as mais seguras e fidedignas. Dois casos devem ser considerados separadamente: a pesquisa de trofozoítas e a pesquisa de cistos.

Para a pesquisa de trofozoítas a técnica indicada é o exame a fresco, sem coloração, de uma partícula de fezes emulsionada em solução fisiológica. Os trofozoítas são reconhecíveis pela sua morfologia e locomoção características. É claro que para isto o material deve ter sido recentemente colhido.

A pesquisa de trofozoítas a fresco deve ser feita em fezes disentericas ou diarreicas normalmente passadas pelo paciente, nas fezes obtidas mediante purgativo ou enema e nos exsudatos ou material raspado de lesões durante a retossigmoidoscopia. Com relativa frequência trofozoítas são também encontrados em fezes pastosas ou no induto que, às vezes, recobre as fezes formadas. Como assinalam ANDERSON & col.⁹, é erro protelar-se o exame de fezes formadas, na suposição de que nelas não se encontrarão trofozoítas.

O exame a fresco para a pesquisa de trofozoítas tem, porém, limitações sérias. Com frequência os trofozoítas imobilizam-se e permanecem imóveis, não se distinguindo dos da *E. coli* e de elementos celulares, especialmente macrófagos e células descamadas. Isto que acontece principalmente no material obtido durante a retossigmoidoscopia, como assinalam FAUST⁵⁶, MELENEY¹⁰⁰ e outros, acontece também com fezes diarreicas e disentericas ou obtidas mediante purgativo ou enema. A grande, a imensa maioria das amostras enviadas ao laboratório ou mesmo colhidas neste não permite o diagnóstico da *E. histolytica* pelo exame a fresco, e neste particular nossa experiência concorda com a de ANDERSON & col.⁹, BROOKE³⁵ e outros.

Visando facilitar a identificação de trofozoítas em preparações não permanentes, diversas soluções corantes têm sido recomen-

dados. Parece que a que tem tido maior aceitação é a de QUENSEL^{85, 94, 124}. VELAT & col.¹³³ aconselham uma solução fresca de cristal violeta e hematoxilina, enquanto SAPERO & col.^{116, 117} recomendam a solução mertiolato-iôdo-formol (MIF). NAIR¹⁰² propõe a modificação do pH das fezes com soluções tampões de acetato, citrato ou ftalato, que tornariam o núcleo visível.

Diversos autores têm feito uso e notado vantagens desta ou daquela solução, mas a nossa experiência tem sido má, mesmo com a solução de Quensel. Em quase todos os casos em que o exame a fresco sem coloração deixa dúvidas quanto ao diagnóstico, o uso destas soluções não resolve o problema e temos que recorrer aos esfregaços corados pela hematoxilina férrica.

Para a pesquisa de cistos, o exame a fresco sem coloração não dá resultados satisfatórios. Para a correta identificação, os cistos devem ser corados e o corante mais indicado, a nosso ver, é ainda o lugol. Os resultados obtidos no exame de preparados corados pelo lugol são idênticos aos obtidos no exame de esfregaços corados pela hematoxilina férrica (BARRETTO¹⁶). Se bem que a pesquisa dos cistos seja mais fácil e a identificação mais segura nos esfregaços corados pela hematoxilina férrica, a complexidade técnica não justifica seu emprêgo na generalidade dos casos.

A solução de lugol pode ser substituída pela de mertiolato, iôdo e formol (MIF) de SAPERO & LAWLESS¹¹⁶ ou mercúrio-cromo, iôdo e formol de COUTINHO⁴³. Como assinala FAUST⁵⁸, o lugol determina uma retração dos cistos, quando o exame não é feito imediatamente. Assim sendo, quando se torna necessária a medição de cistos para distinguir a *E. histolytica* da *E. hartmanni*, o uso do MIF é mais recomendável.

B. Preparações permanentes. Como dissemos, a identificação dos trofozoítas da *E. histolytica* ao exame a fresco não pode ser considerada como definitiva, a não ser naqueles casos em que todos os caracteres típicos sejam evidenciados. Isto acontece nas fezes disentéricas e nos exsudatos ou material raspado de lesões durante a retossigmoidoscopia e examinados dentro do prazo de 15 minutos aproximadamente. Na maioria

dos casos isto não acontece. As causas de êrro do exame a fresco são múltiplas e os êrros de diagnóstico que efetivamente se cometem são excessivamente freqüentes, de modo que êste método não pode ser empregado na rotina dos laboratórios clínicos, como já assinalara JAMES⁷⁵.

Mas não é só no caso de trofozoítas que isto acontece. Como bem salientam ANDERSON e col.⁹ e outros, mesmo os preparados corados pelo lugol ou MIF, para o diagnóstico de cistos, nem sempre constituem processo inteiramente fidedigno. É o que acontece, por exemplo, nos casos de infecção por amostras de *E. histolytica* com cistos pequenos, que se distinguem mal dos cistos maiores da *E. hartmanni*.

Daí a necessidade do exame de esfregaços fixados e corados pela hematoxilina férrica. Além de permitir diagnóstico seguro, os esfregaços corados podem revelar parasitos que passam despercebidos ao exame de preparações não permanentes^{9, 16, 18, 35, 60, 67, 138}. Isto acontece principalmente quando se pesquisam trofozoítas. Trabalhando com material obtido de lesão retossigmoidiana, BARRETTO & SILVA¹⁸ verificaram que o exame a fresco deu 47,3% de positividade, contra 60,8% de resultados positivos fornecidos pelo exame de esfregaços corados. Pesquisando trofozoítas em fezes formadas ou pastosas em 50 casos de amebíase crônica, assintomática ou não, obtivemos 4% de resultados positivos no exame direto e 22% em esfregaços corados pela hematoxilina férrica (BARRETTO¹⁴).

A feitura de esfregaços corados pela hematoxilina férrica, por outro lado, permite ao laboratorista obter auxílio de outros, quando se torna necessária a resolução de dúvidas.

Para a fixação, a solução de Schaudinn é a que tem merecido a preferência dos protozoologistas, que, em geral, recomendam a fixação a quente, durante 5 minutos, ou a frio, durante 15-60 minutos.

Confirmando trabalhos anteriores de WENRICH & GEIMAN¹³⁷ e de WENRICH¹³⁵, mostramos que se obtém boa fixação para os trabalhos de rotina com o Schaudinn puro ou diluído ao meio, durante 1 minuto à temperatura ambiente¹⁵. Por outro lado, o

líquido de Schaudinn pode ser substituído pelo de Bouin-Hollande ou pelo de Gilson^{15, 136}.

Para a mordenação e coloração dos esfregaços podem ser usados métodos que empregam o mordente (alúmen de ferro) e o corante (hematoxilina) em uma única solução. Vários têm sido recomendados. Para colorações rápidas a solução que melhores resultados dá é o hemalúmen de LILLIE⁸⁶, como mostramos em trabalho anterior²².

Resultados superiores são obtidos com o uso de mordentes e corantes em soluções separadas. Para coloração rápida a nossa preferência recai sobre o alúmen ácido de LANG⁸⁴ e a hematoxilina ácida de MARKEY & col.⁹⁸, segundo a técnica de BARRETTO & ZAGO²³, que preenche os seguintes requisitos, além da rapidez: bom contraste, consistência e regularidade de resultados, estabilidade das soluções e desnecessidade de diferenciação no mordente. Os resultados não são comparáveis aos fornecidos pelos métodos lentos clássicos, mas são satisfatórios para os trabalhos de rotina.

Entre os métodos mais demorados são recomendáveis o de FAUST⁴⁶ ou a modificação de AMARAL¹. Os processos lentos de Heidenheim ou Dobell só são recomendáveis para os trabalhos de investigação.

B. Métodos de concentração. Os métodos de concentração são indispensáveis no diagnóstico da amebíase porque revelam cistos quando estes ocorrem em pequeno número e passam despercebidos nas preparações coradas pelo lugol ou pela hematoxilina férrica. Mesmo no caso de fezes ricas em cistos, os métodos de concentração são úteis porque permitem o encontro dos parasitos mais fácil e rapidamente. Infelizmente até agora não se conseguiu um método de enriquecimento para trofozoítas.

Numerosos são os métodos de concentração propostos. Na atualidade quatro disputam a preferência dos protozoologistas.

a. *Centrífugo-sedimentação no ácido-éter.* Introduzido por TELEMANN¹²⁸ e depois modificado por RIVAS¹¹³, este método foi muito usado no passado. É ainda empregado por diversos autores entre os quais os parasitologistas da Escola Chilena.

Embora dê resultados satisfatórios para a pesquisa de cistos de protozoários e ovos de helmintos, tem sérias desvantagens: 1) com freqüência os cistos da *E. histolytica* sofrem retrações e deformações, dificultando o diagnóstico diferencial com a *E. hartmanni*; 2) as preparações feitas com o sedimento centrifugado contêm muitos detritos que dificultam a pesquisa dos cistos; 3) os resultados fornecidos são inferiores aos que se obtêm com a centrífugo-flutuação no sulfato de zinco¹⁴.

O método de Telemann-Rivas seria indicado para a concentração de cistos em fezes gordurosas, nas quais a centrífugo-flutuação no sulfato de zinco não dá resultados satisfatórios. Mas, nestes casos, é preferível usar-se a centrífugo-sedimentação no formol-éter que, como veremos adiante, não produz deformação dos cistos e tem, em adição, a vantagem de poder ser aplicada a fezes conservadas em formol.

b. *Centrífugo-flutuação no sulfato de zinco.* Este método, proposto por FAUST & col.⁶⁰, é o mais eficiente para a pesquisa de cistos de protozoários e ovos de helmintos e, em particular, cistos de *E. histolytica* em fezes não previamente fixadas^{1, 3, 4, 14, 16, 44, 45, 46, 55, 56, 62, 87, 90, 101, 125, 130, 135}. Mas ele pode também ser usado em fezes conservadas em formol^{1, 123}, desde que esta conservação não vá além de uma semana ou dez dias, no máximo.

Diversas modificações do método de Faust & col. têm sido propostas, algumas pequenas, outras mais substanciais, como por exemplo a substituição do sulfato de zinco pelo nitrato de cobre⁶³, a supressão da centrifugação^{13, 105}, o uso da solução do sulfato de zinco mais concentrada^{120, 121, 123}, a supressão da coagem inicial da suspensão de fezes^{28, 123, 134}, o uso de água quente²⁴, a supressão da lavagem das fezes em água antes da suspensão no sulfato de zinco³¹, o uso de tubos plásticos para centrifugação²⁷, a modificação da maneira de recolher os cistos^{116, 120, 121}. Segundo nossa experiência, porém, a técnica original n.º 8 de FAUST & col.⁶⁰ é a mais indicada e a que deve ser usada na rotina.

As vantagens desta técnica são: é eficiente, revelando cistos mesmo em casos muito

pobres; não produz deformações nem retração dos cistos; não lhes altera a viabilidade, permitindo a obtenção de culturas a partir do material concentrado, desde que o contato com a solução de sulfato de zinco não seja prolongada; permite a obtenção de preparações limpas, com poucos detritos, onde a pesquisa dos parasitos é fácil; não altera a colorabilidade dos cistos pelo lugol ou pelo MIF; não impede a coloração pela hematoxilina férrica, desde que isto seja necessário, bastando que os cistos recolhidos sejam lavados uma vez em água e, depois de centrifugados, misturados com uma gotícula de soro.

A única desvantagem do método da centrifugo-flutuação no sulfato de zinco reside no fato de não dar bons resultados em fezes gordurosas, como mostrou BEAVER²⁸. Nestas condições o método não só produz boa concentração, como também, e principalmente, falha com grande frequência. Fezes contendo bismuto, bário, magnésia, carvão adsorvente, óleos minerais ou outros produtos usados como laxantes, não se prestam para a concentração no sulfato de zinco, como, aliás, não se prestam para tratamento por outros métodos de enriquecimento.

c. *Centrifugo-sedimentação no formol-éter*. Este método, desenvolvido por RITCHIE¹¹⁰, tem sido recomendado por vários autores como superior à centrifugo-flutuação no sulfato de zinco^{104, 109, 111, 112, 139, 140}.

Estudos levados a efeito em nosso Departamento por FERRIOLLI & SIÉSSERE⁶¹ mostram o contrário. Além de mais complicado e de fornecer preparações cheias de detritos no meio dos quais a visualização dos cistos se torna mais difícil, dá menor número de resultados positivos.

Tem, porém, a vantagem de poder ser usado em fezes gordurosas, nas quais o método de Faust & col. falha, como já vimos. Também pode ser usado em fezes conservadas em formol durante muito tempo, circunstância em que a centrifugo-flutuação no sulfato de zinco também não dá bons resultados. Todavia, cumpre-nos ressaltar que, quando as fezes são conservadas em formol durante muito tempo, a coloração dos cistos pelo lugol é precária.

d. *Centrifugo-sedimentação no mertiolato-iôdo-formol-éter* (MIFC). Esta técnica foi desenvolvida por BLACC & col.³² para a concentração de cistos em fezes conservadas no MIF de SAPERO & col.^{116, 117}, mas também pode ser usada em material fresco³⁵. O MIFC tem sido recomendado por muitos autores^{77, 90, 91, 92, 101}.

COUTINHO⁴³, como já vimos, modificou o MIF e, empregando-o na técnica de BLACC & col.³², obteve resultados idênticos aos fornecidos pela centrifugo-flutuação no sulfato de zinco, que serviu de termo de comparação. Aquêl autor aconselha o MIFC modificado para a conservação e exame de fezes colhidas nas zonas rurais.

Em nossas mãos o MIFC original ou modificado tem dado resultados comparáveis aos fornecidos pelo método de RITCHIE¹¹⁰, do qual se aproxima muito quanto à exequibilidade, característicos dos preparados, etc. Tem sobre o Ritchie a desvantagem de usar um fixador mais caro e complicado.

c. *Orientação a seguir*. As fezes recebidas pelo laboratório, de preferência sem fixar, ou fixadas em formol, devem ser submetidas à concentração pelo método da centrifugo-flutuação no sulfato de zinco.

Se os resultados da pesquisa de cistos forem negativos e se as fezes, sobretudo quando não fixadas, mostrarem durante a lavagem em água, alto teor de gorduras, devem ser submetidas a uma segunda concentração pela centrifugo-sedimentação no formol-éter.

Se ainda os resultados forem negativos e principalmente se as fezes forem diarréicas ou semiformadas, uma porção destas fezes, frescas ou conservadas em Schaudinn ou Gilson, deve ser examinada em esfregaços corados pela hematoxilina férrica.

As fezes disentéricas frescas, se possível, ou conservadas em Schaudinn ou Gilson, serão examinadas também em esfregaços corados pela hematoxilina férrica porque é praticamente inútil nelas pesquisar cistos. O mesmo se diga do material retossigmoidiano (exsudato ou raspado de lesões), que deve ser sempre fixado imediatamente após a colheita e depois corado.

IV. EXAMES DE FEZES REPETIDOS E EXAME DE FEZES COLHIDAS MEDIANTE CATÁRTICO OU ENEMA

Diversas investigações existem a respeito da variabilidade do número de parasitos eliminados. TSUCHIYA¹³¹ observou que o número de cistos varia de dia para dia, com máximos atingidos periodicamente com intervalos de 8-10 dias. LINCICOME⁸⁸, em trabalho experimental bem conduzido em macacos *rhesus*, observou periodicidade, com ciclos durando de 10 a 14 dias. Segundo KERSHAW⁸³, a eliminação de cistos se dá obedecendo um ciclo definido. Por outro lado, MARSDEN & SMITH⁹⁹, SCHENSNOVICH & SMIRNOVA¹¹⁹ e outros afirmam que não há periodicidade, mas variações numéricas irregulares e ao acaso, com fases negativas de duração variável.

Seja como fôr, as investigações de numerosos autores desde DOBELL⁵² têm demonstrado que o exame repetido de amostras de fezes colhidas em dias sucessivos aumenta a possibilidade de encontro do parasito, isto é, revela maior número de casos da infecção em uma determinada população. Depois do advento do método de Faust e col., o mais eficiente para a concentração de cistos como já vimos, diversos trabalhos têm mostrado a necessidade de repetição dos exames de fezes^{1, 6, 7, 8, 16, 29, 118, 130}.

Do ponto de vista teórico é impossível dizer qual o número de amostras que se deve examinar para que um indivíduo dado possa ser considerado livre de infecção pela *E. histolytica*. Trabalhos acima citados mostram que cinco ou seis exames pelo método da centrífugo-flutuação no sulfato de zinco são suficientes para pôr em evidência praticamente todos os casos de infecção. Baseados nestas verificações e em sua própria experiência, ANDERSON & col.⁹ sugerem o exame de seis amostras seriadas, utilizando métodos de concentração e esfregaços corados pela hematoxilina férrica.

Na prática, porém, a realização de seis exames sucessivos é inexequível, como assinala AMARAL⁴, a não ser em casos excepcionais. FAUST^{55, 56, 57} aconselha exame de três amostras de fezes passadas normalmente e colhidas com intervalos de 3-4 dias. BROOKE³⁵ diz que se deve realizar pelo me-

nos dois ou três exames espaçados de vários dias. Em trabalho anterior (BARRETTO¹⁶) mostramos que o esquema aconselhado por FAUST^{55, 56, 57} permite revelar grande maioria dos casos de infecção.

Por outro lado, diversos autores têm salientado o valor do emprêgo de purgativo salino para aumentar a proporção de casos positivos ao exame de fezes, como já vimos. Tendo em vista a grande eficiência do método de Faust & col. e o aumento de positividade das fezes condicionado pelo uso de purgativos, SAWITZ & HAMMERSTRON^{118a} sugeriram a combinação do exame de três amostras de fezes normais, pelo método de Faust, com o de fezes obtidas mediante purgativo e coradas pela hematoxilina férrica. FAUST^{56, 57} recomenda também esta combinação. Entre nós, AMARAL & PIRES⁷ acham que o exame de duas amostras de fezes normalmente passadas é suficiente, antes de submeter o paciente a um catártico. Mais recentemente AMARAL⁴ procura mostrar que o exame, pelo método de Faust & col., de uma amostra de fezes normalmente passadas, seguido do exame de uma amostra de fezes obtidas mediante purgativo e coradas pela hematoxilina, é suficiente para revelar praticamente todos os casos positivos. BROOKE³⁵ julga necessário que se examinem duas ou três amostras de fezes, com intervalo de vários dias, antes de se recorrer ao purgativo.

Trabalhando com indivíduos comprovadamente infectados pela *E. histolytica* e distinguindo esta espécie da *E. hartmanni*, o que não fizeram os autores que nos precederam, mostramos que o exame pelo método da centrífugo-flutuação no sulfato de zinco, praticado em três amostras colhidas com intervalos de 3-4 dias, dá resultados equivalentes aos fornecidos pelo exame de uma amostra de fezes normalmente passadas, seguido do exame de material obtido por purgativo, isto é, 91,8% e 90,6%, respectivamente. Tendo em vista os inconvenientes e as contra-indicações eventuais do purgativo, recomendamos a realização de três exames pelo método de Faust & col., de fezes normalmente passadas, para o diagnóstico dos casos crônicos¹⁶.

Visto que, em certas circunstâncias mesmo nos casos crônicos, pode haver elimina-

ção só de trofozoítas, aconselhamos a suplementação do método de Faust & col. pelo exame de esfregaços corados pela hematoxilina. Esta norma é indispensável quando se trata de fezes diarréicas.

Nos casos de disenteria, muito mais raros entre nós, só o exame de esfregaços corados pela hematoxilina deve ser feito.

V. ORIENTAÇÃO A SEGUIR NA PRÁTICA E SELEÇÃO DE MÉTODOS

Do que vimos de expor, podemos concluir que para o diagnóstico da amebíase intestinal dois métodos fundamentais de exame devem ser usados: o da centrífugo-flutuação no sulfato de zinco, visando a pesquisa de cistos, e o de esfregaços corados pela hematoxilina férrica, para a pesquisa de trofozoítas e, eventualmente, confirmação de diagnóstico de cistos. Em alguns casos, aqueles representados por fezes com alto teor de gorduras, o método da centrífugo-flutuação no sulfato de zinco pode ser suplementado ou substituído pelo da centrífugo-sedimentação no formol-éter.

A. *Laboratórios hospitalares* — Estes laboratórios dispõem de recursos com os quais outros não podem contar, isto é, podem receber material fresco, imediatamente após a colheita.

Com uma parte da amostra recebida, quer se trate de fezes disentéricas, diarréicas, pastosas ou formadas, confeccionam-se imediatamente esfregaços que são fixados no líquido de Schaudinn ou de Gilson, para posterior coloração. Em seguida, a outra parte da amostra é submetida à concentração pela centrífugo-flutuação no sulfato de zinco. Se o resultado for negativo e se durante a realização deste método se verificar que as fezes contêm certo teor de gorduras, outra parte da amostra deve ser submetida à concentração pela centrífugo-sedimentação no formol-éter. Se persistir a negatividade para cistos, os esfregaços fixados devem ser corados pela hematoxilina e nêles pesquisados trofozoítas, particularmente tratando-se de fezes não formadas.

Sendo necessário, novas amostras serão colhidas com intervalos de 3-4 dias e estas

amostras serão tratadas segundo as normas acima estabelecidas.

Não havendo contra-indicação e havendo permanência em confirmar um diagnóstico, deve-se colhêr uma amostra de fezes normalmente passadas, que é examinada pelo método de Faust & col. (e de Ritchie se for o caso); logo depois outra amostra é colhida mediante a administração de purgativo salino ao doente e esta amostra é examinada após coloração pela hematoxilina férrica.

É necessário insistir que os esfregaços para coloração pela hematoxilina devem ser feitos logo depois da colheita da amostra de fezes normalmente passadas ou obtidas por purgativo. Se houver demora na remessa das fezes ao laboratório, e, portanto, risco de degeneração dos trofozoítas, então uma parte deve ser fixada em Schaudinn ou Gilson.

B. *Laboratórios de análises, particulares ou de Serviços de Saúde Pública* — Estes laboratórios, via de regra, não têm a oportunidade de receber amostras de fezes frescas, em bom estado para a pesquisa de trofozoítas.

Nestas condições, devem fornecer ao doente diretamente, ou ao seu médico, conforme o caso, o material e líquidos fixadores necessários à colheita e conservação adequada das fezes. Duas amostras da mesma evacuação devem ser colhidas separadamente. Uma deve ser imediatamente fixada em líquido de Schaudinn ou Gilson, pelo próprio doente. A outra amostra deve ser tratada de acordo com as circunstâncias: se o material pode ser remetido logo ao laboratório, de tal modo que este o receba no mesmo dia ou no dia seguinte, as fezes não devem sofrer tratamento algum; se isto não for possível, isto é, se se verificar de antemão que entre o momento da colheita e o de exame deverá decorrer prazo superior a 24 horas, e, sobretudo, se não se puder, durante este tempo, conservar as fezes em geladeira ou simplesmente refrigeradas, então a amostra deve ser fixada em formol a 5%.

A amostra recebida pelo laboratório, não fixada ou conservada em formol, deve ser submetida à concentração pelo método da centrífugo-flutuação no sulfato de zinco (ou

eventualmente pelo método de Ritchie). Sendo negativa a pesquisa de cistos, a amostra fixada no Schaudinn ou Gilson é examinada em esfregaços corados pela hematoxilina férrica.

Havendo necessidade, o exame deve ser repetido com intervalos de 3-4 dias. Em circunstâncias excepcionais, em vez de repetir o exame de fezes normalmente passadas, pode-se submeter o paciente a um purgativo salino. Se êste não puder ir ao laboratório para colheita, deve êle próprio fixar uma amostra da parte líquida das fezes.

C. *Inquéritos epidemiológicos* — Durante a realização de inquéritos é impossível se pretender enviar ao laboratório amostras de fezes frescas, em condições satisfatórias para a pesquisa de trofozoítas, ou porque o laboratório é distante, ou porque a coleta de amostras é demorada, ou ainda porque o volume de amostras é grande demais para poder ser manipulado imediatamente.

Nestas circunstâncias, duas amostras devem ser colhidas, como no caso anterior: uma fixada em Schaudinn ou Gilson e outra em formol. Somente quando há possibilidades de conservação de fezes refrigeradas, e quando a capacidade de exame do laboratório é grande, é que se pode prescindir da fixação em formol, de uma das amostras, que será remetida sem tratamento algum.

SUMMARY

Diagnosis of intestinal amebiasis by coprologic examination.

A detailed critical analysis is given of the methods for collection, preservation, and examination of specimens for the diagnosis of intestinal amebiasis. On the basis of the author's past experience, procedures and techniques are suggested for Hospital, Clinic and Public Health laboratories and for epidemiological surveys.

REFERÊNCIAS

1. AMARAL, A. D. F. — Algumas contribuições do laboratório para o estudo da amebíase. São Paulo, 1944. Tese Fac. Med. Univ. São Paulo.
2. AMARAL, A. D. F. — Nota sobre a incidência de portadores de cistos de *E. histolytica*, numa comunidade rural. Rev. Medicina, São Paulo 26:49-57, 1942.
3. AMARAL, A. D. F. — Problemas de diagnóstico de laboratório da amebíase. São Paulo, 1955. Tese Fac. Med. Univ. São Paulo.
4. AMARAL, A. D. F. — Processos laboratoriais diretos e indiretos para o diagnóstico da amebíase. Folia clin. & biol. 17: 157-164, 1951.
5. AMARAL, A. D. F. & MAYRINK, W. — Diagnóstico de laboratório de protozoários intestinais. III. Modalidade prática para o emprêgo do fixador de Schaudinn (resumo). Rev. paulista Med. 50:460, 1957.
6. AMARAL, A. D. F. & PIRES, C. D. A. — Nota sobre a incidência de portadores de cistos de *Endamoeba histolytica*. Hospital, Rio de Janeiro 22:411-429, 1942.
7. AMARAL, A. D. F. & PIRES, C. D. A. — Estudo comparativo entre o método da centrifugo-flutuação no sulfato de zinco e o da coloração pela hematoxilina férrica de fezes obtidas sob purgativo, no diagnóstico da amebíase. Rev. paulista Med. 30: 307-319, 1947.
8. AMARAL, A. D. F.; PONTES, J. F. & PIRES, C. D. A. — Amebíase: estudo etiopatogênico, clínico, terapêutico e epidemiológico. São Paulo, 1947.
9. ANDERSON, H. H.; BOSTICK, W. L. & JOHNSTONE, H. G. — Amebiasis. Pathology, diagnosis and chemotherapy. Springfield, Charles C. Thomas, 1953.
10. ANDREWS, J. — The diagnosis of intestinal protozoa from purged and normally-passed stools. J. Parasitol. 20:253-254, 1934.
11. ANDREWS, J. & PAULSON, M. — The effect of barium sulfate upon the incidence of human intestinal protozoa. J. Lab. & clin. Med. 16:39-42, 1930.
12. ARTIGAS, J. — Técnica de tinción por hematoxilina molibídica para protozoos en frotis de deposiciones preservadas en fijador con alcohol polivinílico. Bol. chil. Parasitol. 10:57-58, 1955.
13. BARBOSA, N. C. — Pesquisa de parasitas nas fezes. Rev. brasil. Med. 14:238-240, 1957.
14. BARRETTO, M. P. — Diagnóstico da amebíase crônica. Estudo comparativo da eficiência dos métodos de Faut e col. e de Teleman-Rivas, usados sós ou combinados

- com o exame de esfregaços corados pela hematoxilina férrica. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 2:305-312, 1960.
15. BARRETTO, M. P. — Estudos sobre a coloração de protozoários intestinais. V. Fixação de esfregaços para coloração pelas lâminas metálicas da hematoxilina. Rev. brasil. Biol. (no prelo).
 16. BARRETTO, M. P. — Diagnóstico da amebíase crônica. II. Estudo comparativo da eficiência do método da centrifugo-flutuação no sulfato de zinco, em amostras sucessivas de fezes normalmente emitidas, e do exame de fezes obtidas mediante cáterico, usados sós ou combinadamente. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo (no prelo).
 17. BARRETTO, M. P. & BAPTISTA, A. C. — Novo meio para a cultura da *Entamoeba histolytica*. Rev. bras. Biol. (no prelo).
 18. BARRETTO, M. P. & SILVA, G. A. — Estudos sobre a amebíase retossigmoidiana. I. Diagnóstico de laboratório das lesões. Rev. brasil. Gastroenterol. 12:147-160, 1960.
 19. BARRETTO, M. P. & SILVA, G. A. — Estudos sobre a amebíase retossigmoidiana. II. Frequência de lesões da amebíase crônica. Rev. brasil. Gastroenterol. 12:209-222, 1960.
 20. BARRETTO, M. P. & SILVA, G. A. — Estudos sobre a amebíase retossigmoidiana. III. Tipos de lesões presentes na amebíase crônica e sua especificidade. Rev. brasil. Gastroenterol. 12:225-238, 1960.
 21. BARRETTO, M. P. & SILVA, G. A. — Comparação entre o valor do exame coprológico e o do exame de material curado durante a retossigmoidoscopia em casos de amebíase crônica. Rev. brasil. Gastroenterol. 13:11-24, 1961.
 22. BARRETTO, M. P. & ZAGO Fº, H. — Estudo sobre a coloração de protozoários intestinais. I. Métodos rápidos que empregam mordentes e corantes em uma única solução. Rev. brasil. Biol. 19:421-428, 1959.
 23. BARRETTO, M. P. & ZAGO Fº, H. — Estudos sobre a coloração de protozoários intestinais. II. Métodos rápidos que empregam mordentes e corantes em soluções separadas. Rev. brasil. Biol. 20:131-138, 1960.
 24. BAROODY, B. J. — Modification of the Faust method in the detection of cysts and ova. J. Lab. & clin. Med. 31:1372-1374, 1946.
 25. BASNUEVO, J. G. & FIGARES, E. — La solución F2AM y el raspado de la mucosa rectal en el diagnóstico de la amebíasis. Rev. Kuba Med. trop. & Parasitol. 13:60-67, 1957.
 26. BASNUEVO, J. G. & FIGARES, E. — La solución F2AM para la conservación de trofozoítas y quites de *Entamoeba histolytica*. Rev. Kuba Med. trop. & Parasitol. 13:85-87, 1957.
 27. BAYONA, A. G. — Tubo plástico en técnicas de flotación para investigar parásitos intestinales. Ciencia, México 14:265-268, 1955.
 28. BEAVER, P. C. — The detection and identification of some common nematode parasites of man. Amer. J. clin. Pathol. 22:481-494, 1952.
 29. BELTRAN, E. — Resultados comparados de diversos métodos para el diagnóstico de protozoarios intestinales. Rev. Inst. Salubr. & Enferm. trop. 5:175-184, 1944.
 30. BELTRAN, E. & LARENAS, R. — Protozoarios intestinales en una comunidad escolar de la ciudad de México. Rev. Inst. Salubr. & Enferm. trop. 2:193-212, 1941.
 31. BIJLMER, J. — Recovery of protozoa and eggs of some species of helminth in human feces. J. Parasitol. 34:101-107, 1948.
 32. BLAGG, W.; SCHLOEGEL, E. L.; MANSOUR, N. S. & KHALAF, G. I. — A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 4:23-28, 1955.
 33. BOECK, W. C. & DRBOHLAV, J. — The cultivation of *Entamoeba histolytica*. Amer. J. Hyg. 5:371-407, 1925.
 34. BORLAND, J. L. — Factors in the diagnosis of intestinal protozoa in man and in the interpretation of the findings. Amer. J. digest. Dis. 7:401-407, 1940.
 35. BROOKE, M. M. — Amebiasis. Methods in laboratory diagnosis. Publ. Health Serv., Com. Dis. Center, Atlanta, Georgia, 1958.
 36. BROOKE, M. M.; DONALDSON, A. W. & BROWN, E. — An amebiasis survey in a veterans administration hospital, Chamblee, Georgia, with comparison of technics. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 3:615-620, 1954.
 37. BROOKE, M. M. & GOLDMAN, M. — Polyvinyl alcohol-fixative as a preservative and adhesive for protozoa in dysenteric stools and other liquid materials. J. Lab. & clin. Med. 34:1554-1560, 1949.
 38. BROOKE, M. M.; MELVIN, D. M.; SAPPENFIELD, R.; PAYNE, F.; CARTER, F. R. N.; OFFUTT, A. C. & FRYE, W. W. — Studies of a waterborne outbreak of amebiasis, South Bend, Indiana. III. Investigation of family contacts. Amer. J. Hyg. 62:214-226, 1955.

39. BROOKE, M. M.; SWARTZWELDER, C.; PAYNE, F. J.; WEISTEIN, P. & FRYE, W. W. — Intestinal parasite survey of Korean prisoner-of-war camp. U.S. Armed Forces med. J. 7:708-714, 1956.
40. BROWN, P. W. — Nature, incidence and treatment of endamebiasis. J. Amer. med. Assoc. 86:457-462, 1926.
41. BUCHMAN, E.; KULLMAN, H. J. & MARGONIS, G. F. — Evaluation of the complement fixation test in amebiasis. Gastroenterology 21:391-399, 1952.
42. BUONOMINI, G. & BRACCINI, L. — Sulla diagnosi parassitologica di amebiasi. Nota II. Proposta di uno schema di indagini ai fine di una corretta diagnosi di *E. histolytica*. Rev. ital. d'Igiene 14:6-23, 1954.
43. COUTINHO, J. O. — Notas sobre modificações do "MIFC" na conservação de fezes para pesquisa de cistos de protozoários. Arq. Fac. Hig. & Saúde públ. São Paulo 10:65-70, 1956.
44. COUTINHO, J. O. — Contribuição para o estudo da epidemiologia da amebíase. São Paulo, 1959. Tese Fac. Hig. Saúde públ. São Paulo.
45. CRAIG, C. F. — The etiology, diagnosis and treatment of amebiasis. Baltimore, Williams & Wilkins, 1944.
46. CRAIG, C. F. — Laboratory diagnosis of protozoan diseases. Philadelphia, Lea & Febiger, 1948.
47. CRAIG, C. F. & FAUST, E. C. — Clinical parasitology. Philadelphia, Lea & Febiger, 1951.
48. CUNHA, A. M. — Protozoários intestinais das crianças no Rio de Janeiro. Sci. Med. 6:103-109, 1928.
49. D'ANTONI, J. S. — Standardization of the iodine stain for wet preparations of intestinal protozoa. Amer. J. trop. Med. 17:79-84, 1937.
50. D'ANTONI, J. S. — Amebic and bacillary colitis in the New Orleans area. Amer. J. trop. Med. 22:319-324, 1942.
51. D'ANTONI, J. S. — Further observations on amebic and bacillary colitis in the New Orleans area. Amer. J. trop. Med. 23:237-242, 1943.
52. DOBELL, C. — Amoebic dysentery and the protozoological investigation of cases and carriers. Med. Res. Comm., Special Rep. Serv., n° 4, pp. 9-85, 1917.
53. DOLKART, R. E.; HALPERN, E. & CULLEN, J. — The diagnosis of amebiasis, the role of the complement fixation test, and the incidence of the disease in the Chicago area. J. Lab. & clin. Med. 38:804, 1951.
54. ELSDON-DEW, R. & MADDISON, S. E. — Amoebic complement-fixation reaction. J. trop. Med. & Hyg. 55:208-211, 1952.
55. FAUST, E. C. — Some modern conceptions of amebiasis. Trans. Stud. Coll. Physic. Philadelphia, 4s. 2:101-113, 1943.
56. FAUST, E. C. — Amebiasis. Métodos diagnósticos. Rev. med. Córdoba 38:59-75, 1950.
57. FAUS, E. C. — Amebiasis. Springfields, Charles C. Thomas, 1954.
58. FAUST, E. C. — Parasitological surveys in Cali, Departamento del Valle, Colombia. I. Incidence and morphologic characteristics of strains of *Entamoeba histolytica*. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 7:4-15, 1958.
59. FAUST, E. C. & RUSSELL, P. F., ed. — Craig and Faust's Clinical Parasitology. Philadelphia, Lea & Febiger, 1957.
60. FAUST, E. C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C. & LINCICOME, D. R. — Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. J. Parasitol. 25:241-262, 1939.
61. FERRIOLLI F., F. & SIÉSSERE, F. — Estudo comparativo da eficiência dos métodos da centrifugo-flutuação no sulfato de zinco e da centrifugo-flutuação em formol-éter para a pesquisa de cistos de protozoários e ovos de helmintos nas fezes. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo (no prelo).
62. GALVÃO, A. L. A. — Estudos epidemiológicos sobre enteroparasitoses em Araraquara. São Paulo, 1953. Tese Fac. Hig. Saúde públ. São Paulo.
63. GARCIA, E. & PESIGAN, T. P. — The (IHP) centrifugal floatation method for the diagnosis of helminth ova and protozoan cysts in feces. Nat. & Appl. Sci. Bull., Univ. Philipp. 7:299-303, 1940.
64. GOLDBERG, C.; SHALES, W. H. & MINTZER, S. — A clinical report of amoebiasis in infants under one year of age. J. Pediatr. 40:290-297, 1952.
65. GOLDMAN, M. — Use of polyvinil alcohol to preserve fecal smears for subsequent staining. Science, London 106:42, 1947.
66. GOLDMAN, M. — Polyvinil alcohol-fixative method for shipping fecal smears. Publ. Health Lab. 6:38-39, 1948.

67. GOLDMAN, M. & BROOKE, M. M. — Protozoans in stools unpreserved and preserved in PVA-fixative. Publ. Health Rep. 68: 703-706, 1953.
68. GOREVITCH, J. & DELIGHTISH, J. — Survival time of *Endamoeba histolytica* in feces. Harefuah 32:60, 1947.
69. GREENWAY, D. & CASTEX, M. — Consideraciones parasitológicas y clínicas sobre 2.700 casos de amebiasis intestinal. An. Fac. Cienc. Med. La Plata 1/2:171-213, 1937.
70. HAEDICKE, T. A. — Clinical value of the complement fixation test for hepatic amebiasis. M. Ann. Distr. Columbia 20:415-420, 1951.
71. HARPER, K.; LITTLE, M. D. & DAMON, S. R. — Advantages of the PVA-fixative two-bottle stool collection technic in the detection and identification of intestinal parasites. Publ. Health Lab. 15:96, 1957.
72. HARPER, K.; LITTLE, M. D. & MARS-HALL, A. L. — Comparison of stool collection techniques in amebiasis investigations. Publ. Health Rep. 72:1031-1037, 1957.
73. HUSSEY, K. L. & BROWN, H. W. — The complement fixation test for hepatic amebiasis. Amer. J. trop. Med. 30:147-157, 1950.
74. JACKMAN, R. J. & COOPER, W. L. — Value of proctoscopy in the diagnosis of amebiasis. Am. J. digest. Dis. 10:365-366, 1943.
75. JAMES, W. M. — Diagnosis of intestinal amebiasis. J. Amer. Med. Assoc. 89:1469-1472, 1927.
76. JARPA, A.; ARTIGAS, J.; HEYMANN, E. & TOLEDO, L. A. — Rectoscopia y amebiasis intestinal crónica. III. Estudio parasitário del contenido rectal. Bol. chileno Parasitol. 13:2-7, 1958.
77. JAYEWARDENE, L. G. — The merthiolate-iodine-formaldehyde concentration technique for the detection of parasitic material in fecal samples. Parasitology 47: 405-412, 1957.
78. JESKA, E. L. & GENTZKOW, C. J. — Staining fecal protozoa after fixation in formalin. Amer. J. clin. Pathol. 29:184-185, 1958.
79. JOHNSON, H. J. & EBBESEN, G. K. — Stool specimens collection for laboratory examination for infestation. Industr. Med. & Surg. 27:370-371, 1958.
80. JUNIPER Jr., K.; STEELE, V. W. & CHESTER, C. L. — Rectal biopsy in the diagnosis of amebic colitis. South med. J. 51: 545-553, 1958.
81. KELLEY, G. W. — Evaluation of the PVA method of fixing ameba trophozoites for shipment of diagnostic laboratories. Nebraska med. J. 37:367-368, 1952.
82. KENNEY, M.; WOLF, J. & TATZ, J. S. — The evaluation of the amebic complement-fixation test. Amer. Pract. & Digest. Treat 6:1201-1204, 1955.
83. KERSHAW, W. E. — Diagnosis of amebiasis. Brit. med. J. 1:305, 1946.
84. LANG, A. G. — A stable, high contrast mordant for hematoxylin staining. Stain Technol. 11:149-151, 1936.
85. LANGERON, M. — Précis de microscopie. Paris, Masson, 1949.
86. LILLIE, R. D. — An improved acid hemalum formula. Stain Technol. 17:89-90, 1942.
87. LIMA, E. C. & BARANSKI, M. C. — Diagnóstico laboratorial da amebíase intestinal. Arq. Biol. & Tecnol. 9:5-20, 1954.
88. LINCICOME, D. R. — Flootation in number of cysts of *Endamoeba histolytica* and *Endamoeba coli* in stools of Rhesus monkeys. Amer. J. Hyg. 36:321-337, 1942.
89. LIPPI, M.; CAPOCACCIA, L. & CAO-PINNA, M. — Ricerche sulla reazione di deviazione del complemento nell'amebiasi. Arch. ital. Sci. med. & Parasitol. 11:605-618, 1952.
90. LONDERO, A. T. — O exame coprológico no diagnóstico das parasitoses. Rev. brasil. Gastroenterol. 11:23-34, 1959.
91. LONDERO, A. T. & MORAIS, L. L. — Usos da solução "M.I.F." de Saperó e col. em parasitologia e higiene. Hospital, Rio de Janeiro 54:107-110, 1958.
92. LONDERO, A. T.; WEIGMANN, S. R.; FISCHMAN, O. & PORTUGAL, A. — Do valor do método "MIFC" ou de Blagg e col. em coprologia microscópica. Hospital, Rio de Janeiro 53:365-370, 1958.
93. McDEARMAN, S. C. & DUNHAM, W. B. — Complement fixation tests as an aid in the differential diagnosis of extra-intestinal amebiasis. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 1:182-188, 1952.
94. MACKIE, T. T.; HUNTER, G. W. & WORTH, C. B. — Manual of tropical medicine. Philadelphia, Saunders, 1945.

95. MAGATH, T. B. — The laboratory diagnosis of amebiasis. J. Amer. Med. Assoc. 103:1218-1224, 1934.
96. MANSON-BAHR, P. & MUGGLETON, W. J. — Rectal biopsy as an aid to the diagnosis of amoebic dysentery and allied diseases of the colon. Lancet (6972)763-765, 1957.
97. MARKELL, E. K. — A comparison of three staining technique for protozoan parasites as applied to PVA-preserved fecal specimens. J. Parasitol. 42:478, 1956.
98. MARKEY, R. C.; CULBERTSON, C. J. & GIORDANO, A. S. — A rapid method for staining of intestinal parasites. Amer. J. clin. Pathol. Tech. Sec. 7:2-3, 1943.
99. MARSDEN, A. T. H. & SMITH, H. F. — The detection of the cysts of *Entamoeba histolytica* in the faeces by microscopical examination. Med. J. Australia 33:915, 1946.
100. MELENEY, H. E. — Some unsolved problems in amebiasis. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 6:487-498, 1957.
101. MORAIS, L. L. — Da necessidade de metodização dos exames coprológicos em Higiene e Medicina Preventiva. Belo Horizonte, 1957. Tese Fac. Farm. Univ. Minas Gerais.
102. NAIR, C. P. — Rapid staining of intestinal amoebae on wet mounts. Nature, London 172:1051, 1953.
103. NORMAN, L. & BROOKE, M. M. — The effectiveness of the PVA-fixative in revealing intestinal amebae in diagnostic cultures. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 4: 479-482, 1955.
104. O'BRYAN, J. M. — Isolation of parasites by three standard methods. Med. Techn. Bull. 4:161-171, 1953.
105. OTTO, G. F.; HEWITT, R. & STRAHAN, D. E. — A simplified zinc sulfate levitation method of fecal examination for protozoan cysts and hookworm eggs. Amer. J. Hyg. 33:32-37, 1941.
106. PIZZI, T. & SILVA, R. — Evaluación de métodos diagnósticos en amebiasis intestinal. Planeamento teórico. Bol. chileno Parasitol. 15:2-6, 1960.
107. REES, C. W. — Problems in amebiasis. Springfield, Charles C. Thomas, 1955.
108. REGONESI, C.; MIRANDA, M. & ARTIGAS, J. — Técnica del fijador con alcohol polivinílico en el diagnostico de la amebiasis y otras enteroparasitosis. Bol. chileno Parasitol. 9:105-109, 1954.
109. RIDDLEY, D. S. & HAWGOOD, B. C. — The value of formol-ether-concentration of fecal cysts and ova. J. clin. Pathol. 9: 74-76, 1956.
110. RITCHIE, L. C. — An ether sedimentation technique for routine stool examinations. Bull. U.S. Army Med. Dept. 8:326, 1948.
111. RITCHIE, L. S.; PAN, C. & HUNTER, G. W. — A comparison of the zinc sulfate and the MGL (formalin-ether) technics. J. Parasitol. 38(Suppl.):16, 1952.
112. RITCHIE, L. S.; PAN, C. & HUNTER, G. W. — A comparison of the zinc sulfate and the formalin-ether (406th MGL) technic. Med. Bull. U.S. Army Far East 1:111-113, 1953.
113. RIVAS, D. de — An efficient and rapid method of concentration for the detection of ova and cyst of intestinal parasites. Amer. J. trop. Med. 8:63-72, 1928.
114. ROSENFELD, G. — Pesquisa de amebas nas fezes. Rev. clin. S. Paulo 2:47-50, 1937.
115. SANCHES, A. — Diagnóstico de parasitos intestinais: estudo comparativo entre os processos de Faust e col, e da sedimentação e de Ferreira e Abreu. Hospital, Rio de Janeiro 41:381-389, 1952.
116. SAPERO, J. J. & LAWLESS, D. K. — The "MIF" stain-preservation technic for the identification of intestinal protozoa. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 2:613-619, 1953.
117. SAPERO, J. J.; LAWLESS, D. K. & STROME, C. P. A. — An improved iodine-staining technique for routine laboratory diagnosis of intestinal protozoa. Science 114:550-551, 1951.
118. SAWITZ, W. G. & FAUST, E. C. — The probability of detecting intestinal protozoa by successive stool examinations. Amer. J. trop. Med. 22:131-136, 1942.
- 118a. SAWITZ, W. G. & HAMMERSTRON, R. J. — The statistical significance of a negative stool examination in the diagnosis of amebiasis. Amer. J. Hyg. 38:1-7, 1943.
119. SCHENSNOVICH, V. B. & SMIRNOVA, E. N. — Observations on discharge of cysts of *Entamoeba histolytica*. Med. Parasitol. & parasit. Dis. 15:82, 1946. (In Trop. Dis. Bull. 44:1000, 1947.)
120. SILVA Jr., M. — Contribuição à profilaxia das helmintoses do homem no Brasil. Rio de Janeiro, IBGE, 1948.
121. SILVA Jr., M. — Novo método de exame parasitológico das fezes: o "detector larvo-cyst". Rev. brasil. Med. 14:545-550, 1957.

122. STOLL, N. R. — Diagnosis of intestinal helminths and protozoa: current perspective. (In MOST, H., ed. — Parasitic infections in man. New York, Columbia Univ. Press, 1951. pp. 56-75.)
123. SUMMERS, W. A. — A modification of zinc sulfate centrifugal floatation method for recovery of helminth ova in formalized feces. J. Parasitol. 28:345-346, 1942.
124. SVENSSON, R. & LINDERS, F. J. — The chances of detecting infections with intestinal protozoa. Acta med. scand. 81: 267-324, 1943.
125. SWARTZWELDER, J. C. — Comparison of five laboratory techniques for demonstration of intestinal parasites. J. trop. Med. Hyg. 42:185-187, 1939.
126. SWARTZWELDER, J. C. — Laboratory diagnosis of amoebiasis. Am. J. clin. Pathol. 22:379-395, 1952.
127. SWARTZWELDER, J. C. & MULLER, G. R. — Failure to demonstrate precipitin in dogs infected with *Endamoeba histolytica*. J. Parasitol. 35(Sec. 2):32, 1949.
123. TELEMANN, W. — Eine Methode zur Erleichterung der Auffindung von Parasiteneier in der Faeces. Deut. med. Wochenschr. 34:1510-1511, 1908.
129. TERRY, L. I. & BOZICEVICH, J. — The importance of the complement fixation test in amebic hepatitis. South. med. J. 41:691-702, 1948.
130. TOBIE, J. E.; REARDON, L. V.; BOZICEVICH, J.; SHIH, B. C.; MONTEL, N. & THOMAS, E. H. — The efficiency of the zinc sulfate technic in the detection of intestinal protozoa by successive stool examinations. Amer. J. trop. Med. 31:552-560, 1951.
131. TSUCHIYA, H. — Observations on "encystment cycle" of *Endamoeba histolytica* in a carrier. Proc. Soc. exper. Biol. & Med. 29:930-932, 1932.
132. TSUCHIYA, H. — Survival time of trophozoites of *Endamoeba histolytica* and its practical significance in diagnosis. Amer. J. trop. Med. 25:277-279, 1945.
133. VELAT, C. A.; WEINSTEIN, P. P. & OTTO, G. F. — A stain for the rapid differentiation of the trophozoites of the intestinal amoebae in fresh, wet preparations. Amer. J. trop. Med. 30:43-51, 1950.
134. WATSON, J. M. — A modification of the zinc sulphate centrifugal floatation technique for the concentration of helminth ova and protozoan cysts in feces. Ann. trop. Med. & Parasitol. 41:43-45, 1947.
135. WENRICH, D. H. — The morphology of some protozoan parasites in relation to microtechnique. J. Parasitol. 27:1-18, 1941.
136. WENRICH, D. H. & DILLER, W. F. — Methods of Protozoology. (In McCLUNG's Handbook of microscopical technique. New York, Paul B. Hoeber, 1950. pp. 432-474.)
137. WENRICH, D. H. & GEIMAN, Q. M. — A modification of Schaudinn's fixative for protozoa. Stain Technol. 8:158, 1933.
138. WENRICH, D. H.; STABLER, R. M. & ARNETT, J. H. — *Endamoeba histolytica* and other intestinal protozoa in 1,060 college freshmen. Amer. J. trop. Med. 15: 331-345, 1935.
139. WYKOFF, D. E.; LYMAN, P. F. & RITCHIE, L. S. — Statistical evaluation of the formalin-ether (406 MGL) fecal sedimentation concentration procedure. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 7:150-157, 1958.
140. WYKOFF, D. E. & RITCHIE, L. S. — Efficiency of the formalin-ether concentration technic. J. Parasitol. 38(suppl.):15, 1952.
141. YOUNG, W. — Sources of errors in the laboratory diagnosis of amebiasis. J. Lab. & clin. Med. 21:1149-1154, 1936.
142. YOUNG, V. M.; FELSENFELD, O.; SHALES, W. H.; YOSHIMURA, T. & STEIGMANN, F. — A study of laboratory methods for diagnosing *Endamoeba histolytica* and their application to 5,048 persons from the Chicago area. Amer. J. digest. Dis. 18:126-130, 1951.

Recebido para publicação em 7 fevereiro 1962.