

NOVA MODIFICAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE LOOSS-BAERMANN PARA PESQUISA DE LARVAS DO *STRONGYLOIDES STERCORALIS* NAS FEZES: TÉCNICA DO PIRES

Francisco FERRIOLLI FILHO (1)

RESUMO

O autor descreve uma nova técnica de extração de larvas de *S. stercoralis*, na qual as fezes, dispostas sobre uma peneira de tela de cobre com 7 cm de diâmetro e com 1.225 malhas por cm², são postas em contato com a água contida em um pires de vidro Pyrex de 9 cm de diâmetro. Para evitar a exposição ao ar, as fezes são recobertas com uma latinha munida de pequenos orifícios. As larvas que migram para o pires são pesquisadas ao microscópio entomológico com objetiva 4x e ocular 5x. Quando partículas fecais minúsculas ou substâncias solúveis passam para a água do pires, o que acontece em casos raros, produzindo uma turvação que impede a visualização das larvas, a água é transferida para um tubo de centrífuga, centrifugada a 1.500 r.p.m. durante 2 minutos e o sedimento examinado entre lâmina e lamínula.

Esta técnica, além de simples, fácil de executar, higiênica e econômica, dá resultados idênticos a outras. Em 53 amostras de fezes positivas, submetidas à extração simultaneamente pela técnica de LOOSS-BAERMANN modificada e pela técnica do pires, o autor obteve respectivamente 92,45% e 94,34% de positividade, não havendo diferenças significativas entre estes resultados.

INTRODUÇÃO

Looss¹⁴ apresentou um método para isolamento de larvas de ancilostomídeos que tinha por base o hidrotropismo positivo das mesmas e que vinha complementar o método de cultura de fezes proposto por LEICHTENSTERN¹². Aquêl autor fazia coprocultura com carvão animal em placa de Petri e depois procedia a extração das larvas do seguinte modo: retirando da estufa a mistura fezes-carvão, expunha-a ao ar para dessecar as camadas superficiais e, depois, colocava água até cobrir todo o material. Sendo dotadas de hidrotropismo positivo, em pouco tempo as larvas abandonavam o meio de cultura e passavam para a água; esta era, então, decantada e examinada.

O método de Looss deu origem a inúmeras variantes que podemos classificar em

três grupos: as técnicas em que as fezes são colocadas em contato direto com a água e as que as fezes são dispostas sobre um pedaço de tecido ou de tela metálica e postas em contato com a água respectivamente em um funil ou em um cálice de sedimentação.

A. *Técnicas que utilizam o contato direto das fezes com a água* — Consistem fundamentalmente em colocar fezes (ou culturas) em contato direto com a água e pesquisar nesta as larvas que migraram.

ROUSSEAU (in LEVIN¹³) recomenda comprimir a amostra de fezes entre duas lâminas, dando-lhe um formato circular, e em seguida colocar água em torno das fezes. Em pouco tempo as larvas passam das fezes

Fac. Med. Ribeirão Preto — Dep. Parasitologia (Diretor: Prof. M. P. Barretto).

(1) Assistente.

para o líquido onde podem ser facilmente observadas.

KOLMER & BOERNER⁹ aconselham tomar uma porção de fezes formadas, nelas fazer uma escavação e aí colocar água. As larvas migram das fezes para a água onde são colhidas após 24 horas de incubação a 37°C. Este método foi recomendado por SIMPSON¹⁸ e por KYLE, McCAY & SPARLING¹⁵.

COUTINHO, CAMPOS & AMATO⁶ propõem uma técnica baseada nesse princípio: colocam 2 a 3 g de fezes numa placa de Petri e circundam-na com água a 40-42°C. Após 60 minutos as larvas são encontradas na água, com auxílio de um microscópio entomológico, recolhidas e identificadas, depois de coradas pelo lugol.

B. *Técnicas que empregam um funil* — Nas variantes deste tipo as fezes são colocadas sobre um retalho de tela metálica ou de tecido. Este é adaptado a um funil tendo na haste um tubo de borracha pinçado com pinça de Mohr, funil este que é previamente cheio com água até uma altura tal que as fezes fiquem parcialmente imersas. É fundamentalmente o método de BAERMANN¹ usado para a extração de larvas de nematóides do solo, método este que foi muito bem padronizado para pesquisa de larvas de ancilostomídeos por CORT *et al.*⁵.

Este método foi, ao que parece, utilizado pela primeira vez para a extração de larvas de *S. stercoralis* das fezes por SANDGROUND¹⁷. Este autor aconselhava misturar fezes com carvão e deixar durante 27 a 30 horas à temperatura ambiente. Em seguida fazia a extração das larvas colocando a cultura sobre um pedaço de tecido de algodão grosso preso às bordas de um funil de Baermann cheio de água a 40-42°C.

LEE¹¹ valia-se de um funil forrado com tela metálica sobre a qual espalhava areia esterilizada. A haste do funil era ligada a uma ponta de pipeta por um tubo de borracha pinçada com uma pinça de Mohr. As fezes eram misturadas com areia e colocadas sobre a camada de areia que forrava a tela do aparelho. Deste modo não havia o contato direto entre as fezes e a tela, evitando-se, assim, o acúmulo de detritos no tubo

coletor. Enchia o aparelho cuidadosamente com água, até cobrir o material em exame, e deixava em estufa a 37°C durante 90 minutos. Findo este prazo, colhia a água do funil e nela procurava as larvas.

MORAES¹⁵ introduziu no Brasil a técnica de Baermann-Lee com algumas modificações: as fezes são colocadas sobre uma tela metálica recoberta por gaze e adaptada ao funil. O tubo de borracha preso à haste do funil terminava em um tubo de hemólise. Após 60 a 90 minutos de extração as larvas estavam coletadas no tubo de hemólise; este era removido e o seu conteúdo vertido em vidro de relógio para exame.

COUTINHO, CAMPOS & AMATO⁶, tendo em vista que o ato de retirada do tubo de hemólise dava margem à contaminação do operador, substituíram-no por uma ponta de pipeta e fechamento do tubo de borracha por uma pinça de Mohr, como na técnica de LEE¹¹.

Em trabalho anterior (FERRIOLLI Filho⁸) apresentamos algumas modificações da técnica acima, modificações estas que consistem na substituição da tela metálica de malhas largas e recoberta por gaze, por uma tela metálica de 1.225 malhas por cm². Além disso procuramos eliminar a exposição das fezes ao ar cobrindo-as com uma latinha perfurada. Os orifícios da latinha impedem que se forme uma câmara de ar que, fazendo pressão sobre a superfície da água, dificulta um amplo contato da mesma com as fezes. Neste mesmo trabalho evidenciamos a utilidade do lenço-papel "Yes" (Johnson & Johnson), forrando a tela para os casos em que as fezes se apresentem liquefeitas. Deve-se ressaltar que LOOSS¹⁴ já fazia o uso do papel-filtro para isolar larvas de culturas de fezes.

C. *Técnicas que empregam cálice cônico* — Embora descrita como técnica nova por RUGAI, MATOS & BRISOLA¹⁶, esta variante já tinha sido utilizada por BRUC³. Este autor aconselhava colocar 10 g de fezes sobre um pedaço de pano, fazer um amarrado e suspendê-lo em água contida em um cálice cônico. Após a extração por um período de 60 a 90 minutos, as larvas eram coleta-

das no fundo do cálice com o auxílio de uma pipeta e examinadas entre lâmina e lâmina. Esta técnica ficou ignorada pela generalidade dos pesquisadores e laboratoristas, embora, segundo BIJLMER², ela seja largamente usada na Holanda para o diagnóstico da estrogiloidiase. Esse autor a recomenda como muito eficaz. CHANDLER⁴ também aconselha o método de Brug para extração de larvas das fezes.

A técnica descrita por RUGAI, MATOS & BRISOLA¹⁶ é a seguinte: amostras de fezes, contidas na própria latinha em que são enviadas ao laboratório, são cobertas por uma gaze e colocadas em contato com água aquecida a 40-42°C num cálice de sedimentação. Após 60 a 90 minutos colhe-se o sedimento no fundo do cálice com uma pipeta, transferindo-o para um vidro de relógio onde é examinado. Como se pode notar esta técnica é apenas uma ligeira variante da de BRUC³, conforme já dissemos.

As técnicas em que as fezes são colocadas em contato direto com a água, sem interposição de retallo de tecido, tela metálica ou papel, têm um grave inconveniente, aliás apontado pelos autores que as usaram: as larvas, após a migração para a água muitas vezes permanecem escondidas sob as fezes e não são encontradas ao exame microscópico.

Por outro lado, as variantes que utilizam o funil, cuja haste é ligada a uma ponta de pipeta por um tubo de borracha ou plástico pinçado com pinça de Mohr oferecem, entre outros, os seguintes inconvenientes: o dispositivo em si é mais complicado e caro; sua lavagem é mais trabalhosa e não permite uma esterilização adequada, a menos que o aparelho seja desmontado depois de cada vez que é usado; o tubo de borracha ou plástico se estraga com o pinçamento e deve ser substituído com freqüência; a colheita das larvas em um vidro de relógio por abertura da pinça de Mohr oferece riscos de contaminar as mãos do operador; durante sua migração, larvas podem ficar retidas nas junções do funil ou da pipeta com o tubo de borracha ou plástico.

Finalmente, as variantes que utilizam cálice cônico requerem que as larvas que se sedimentaram sejam removidas com uma pi-

petta. Ora por mais cuidadosa que seja a introdução desta no cálice, sempre se produz um turbilhão na água que pode ressuspender larvas; demais, ao se proceder a remoção do sedimento, as larvas podem não ser aspiradas; ainda mais, larvas podem ficar aderentes à parede da pipeta; finalmente a simples necessidade de se usar pipeta é uma etapa adicional a complicar a técnica.

Assim sendo, concluímos que a solução deveria consistir em fazer a extração das larvas no próprio recipiente em que elas devem ser pesquisadas. Já vimos que a técnica da placa de Petri de COUTINHO, CAMPOS & AMATO⁷ não é totalmente satisfatória. Tentamos a extração colocando fezes sobre a tela metálica adaptada diretamente a um vidro de relógio de concavidade e dimensões adequadas, contendo água. Os resultados foram muito bons, mas o vidro de relógio requeria um dispositivo especial para lhe dar estabilidade. Foi quando descobrimos no comércio um tipo de pires de vidro adequado à finalidade.

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA

Nosso dispositivo (figs. 1 e 2) requer: a) um pires de vidro Pyrex medindo aproximadamente 9 cm de diâmetro e com uma profundidade de cerca de 0,9 cm; b) uma peneira constituída por tela de cobre com 1.225 malhas por cm², montada em um aro circular do mesmo material medindo 7 cm de diâmetro e 1 cm de altura, dotado de um cabo para facilitar a manipulação; c) uma tampa de lata com cerca de 6 cm de diâmetro e munida de orifícios (optativa).

A técnica de operação é a seguinte:

- 1) Tomar 10 g de fezes homogenizadas e com auxílio de um bastão colocá-las sobre a peneira e distribuí-las regularmente sobre a tela metálica, de modo a ocupar uma área de cerca de 5 cm de diâmetro; em casos de fezes muito endurecidas é conveniente, ao homogenizá-las, juntar um pouco d'água para lhe dar consistência menos firme e facilitar o contato com a tela assim como a saída das larvas.

- 2) Cobrir as fezes com a tampa furada e adaptar a peneira sobre o pires.
- 3) Colocar cuidadosamente água aquecida a 40-45°C no pires, até o nível líquido ultrapassar o do fundo da peneira e deixar a extração se processar durante 60 minutos.
- 4) Retirar cuidadosamente a peneira e examinar a água do pires ao microscópio entomológico, com objetiva de 4x e ocular 5x. As larvas se coletam de preferência na parte plana mais funda do pires, embora possam ser encontradas próximas da junção da superfície d'água com as bordas do pires.

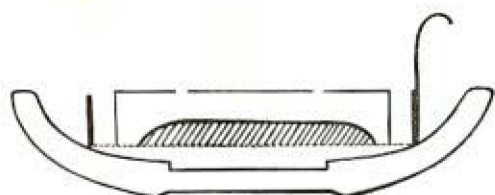


Figura 1

RUGAL, MATOS & BRISOLA¹⁶ salientaram que, na latinha fechada, se forma CO₂ que contribui para maior efetividade da técnica, pois as larvas têm tropismo negativo para este gás. Preferimos, porém, furar a latinha e perder esse tropismo, se é que existe, mas evitar a formação de uma câmara de ar dentro da latinha, cuja pressão impede a água de penetrar e cobrir as fezes (FERRIOLLI Filho⁸).

Acontece, às vezes, que substâncias fecais solúveis ou partículas fecais muito pequenas passam para a água, produzindo turvação e prejudicando a pesquisa direta das larvas no entomológico. Nestes casos, felizmente raros, transferimos o conteúdo do pires para um tubo de centrifuga de 50 ml, centrifugamos durante dois minutos a 1.500 r.p.m. e examinamos o sedimento entre lâmina e lamínula. Não coramos, pois as larvas se conservam móveis e isto facilita o exame.

Após a efetuação dos exames as peças podem ser submetidas à lavagem e esterilização pelo calor, sem perigo de serem danificadas, podendo cada conjunto ser usado indefinidamente.

A técnica acima proposta alia, à sua simplicidade e limpeza, uma eficiência que se comprovou nas comparações a que a submetemos e que serão expostas a seguir.



Figura 2

ESTUDO COMPARATIVO DA EFICIÊNCIA DA TÉCNICA DO PIRES COM A DO MÉTODO DE LOOSS-BAERMANN MODIFICADA

Para esta comparação submetemos amostras de fezes de 89 indivíduos à extração feita simultaneamente pelo método de LOOSS-BAERMANN modificado sucessivamente por MORAES¹⁵, COUTINHO & col.⁶ e FERRIOLLI Filho⁸ e pela técnica acima proposta. Os resultados, obtidos após 60 minutos de extração, são apresentados no quadro I.

QUADRO I

Comparação das técnicas de LOOSS-BAERMANN modificada e do pires em 89 amostras de fezes.

| Técnica | Casos positivos | % sôbre o total de positivos | % sôbre o total de examinados |
|-------------------------|-----------------|------------------------------|-------------------------------|
| Looss-Baermann | 49 | 92,45 | 55,06 |
| Pires | 50 | 94,34 | 56,18 |
| Só Looss-Baermann | 3 | 5,66 | 3,37 |
| Só pires | 4 | 7,55 | 4,49 |
| Ambas | 46 | 86,79 | 51,68 |
| Total | 53 | — | 59,55 |

Como vemos, pela técnica do pires deixaram de ser revelados 3 casos enquanto que pela técnica de LOOSS-BAERMANN modificada não foram revelados 4 casos. Em todos os casos em que ocorreu falha de uma das técnicas tratava-se de material que continha poucas larvas. Não notamos diferenças apreciáveis no número de larvas reveladas por cada técnica e em cada caso.

SUMMARY

A new modification of Looss-Baermann's technique for the extraction of larvae of Strongyloides stercoralis from stools: the dish technic.

A new modification of Looss-Baermann's technique for the extraction of larvae of

Strongyloides stercoralis from stools is described. Stool specimen is placed on a copper-sieve with 1,225 meshes per square centimeter and mounted in a metal ring seven centimeters wide and one centimeter high, having a holder to facilitate manipulation. This sieve is brought into contact with warm water (40-45°C) contained in a Pyrex dish 9 centimeters in diameter. In order to avoid exposition to air the stool specimen on the sieve is covered with a metal cover having two holes.

After an hour, the sieve is removed and *Strongyloides* larvae are searched in the dish with the aid of a stereoscopic microscope. When small fecal particles and soluble substances pass through the screen and produce a turbidity intense enough to obstruct visualization of larvae, the water is transferred to a test tube and centrifugated at 1,500 r.p.m. for two minutes, and the sediment is examined between slide and cover slip.

This technique is simple, hygienic, and economical, and gives good results. Fifty-three positive specimens examined simultaneously by Looss-Baermann's modified technique as well as by the new one gave substantially the same results, that is, 92.4 per cent and 94.34 per cent of positive cases, respectively.

REFERÊNCIAS

1. BAERMANN, G. — Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel. Geneesk. Lab. Weltevreden, Feestbundel, Batavia. pp. 41-47, 1917.
2. BIJLMER, J. — On the recovery of protozoa and eggs of some species of helminths in human feces. J. Parasitol. 34:101-107, 1948.
3. BRUG, S. L. — De methode van Baermann toegepast op he onderzoek der faeces op mijnnowormmeieren. Gen. Tijdeschr. Ned. Indië 61:565-573, 1921.
4. CHANDLER, A. C. — Modern methods for making fecal examination for helminthic infections. Amer. J. Technol. 17:64-68, 1951.
5. CORT, W. W.; ACKERT, J. E.; AUGUSTINE, D. L. & PAYNE, F. K. — Investigations on the control of hookworm disease. II. The description of an apparatus for isolating infective hookworm larvae from the soil. Amer. J. Hyg. 2:1-16, 1922.

FERRIOLLI F^o, F. — Nova modificação do método de extração de Looss-Baermann para a pesquisa de larvas do *Strongyloides stercoralis* nas fezes: técnica do pires. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 3(1):9-14, 1961.

6. COUTINHO, J. O.; CAMPOS, R. & AMATO Neto, V. — Nota sobre diagnóstico e prevalência da estrogiloidose em São Paulo. Rev. clín. São Paulo 27:1-10, 1951.
7. COUTINHO, J. O.; CAMPOS, R. & AMATO Neto, V. — Nota sobre a prevalência da estrogiloidiase em crianças de São Paulo. Folia clin. & biol. 17:191-207, 1951.
8. FERRIOLLI F^o, F. — Diagnóstico da estrogiloidiase. Modificações do método de Baermann-Moraes. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 1:138-140, 1959.
9. KOLMER, J. A. & BOERNER, F. — Approved laboratory technic. New York, Appleton-Century, 1931.
10. KYLE, L. H.; McCAY, D. G. & SPARLING, H. J. — Strongyloidiasis. Ann. int. Med. 29:1014-1027, 1948.
11. LEE, C. U. — Some observations on *Strongyloides stercoralis*. Arch. f. Schiffs u. Tropen-Hyg. 34:262-274, 1930.
12. LEICHTENSTERN, O. — Zur Lebensgeschichte der *Anguillula intestinalis*. Zentralbl. f. Bakt., I. Abt. 25:226-231, 1899.
13. LEVIN, A. L. — The problem of eradication of *Strongyloides intestinalis*. Amer. J. trop. Med. 10:353-363, 1930.
14. LOOSS, A. — The anatomy and life-history of *Anchilostoma duodenale* Dub. Monograph. Rec. Egypt. Govt. School Med. 4:159-613, 1911.
15. MORAES, R. G. — Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidose no Brasil. Rev. S.E.S.P. 1: 507-624, 1948.
16. RUGAI, E.; MATTOS, T. & BRISOLA, A. P. — Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes. Modificação do método de Baermann. Rev. Inst. Adolfo Lutz 14:1-8, 1954.
17. SANDGROUND, J. H. — Some observations on the life-cycle, methods of diagnosis and incidence of *Strongyloides stercoralis* in the tropics. Ann. Rep. United Fruit Co. med. Dept. 14:240-245, 1925.
18. SIMPSON, V. E. — Strongyloidiasis. J. Amer. med. Ass. 112:828-833, 1939.

Recebido para publicação em 20 dezembro 1960.