NOTAS SÔBRE MODIFICAÇÕES DO "MIFC" NA CONSERVAÇÃO DE FEZES PARA PESQUISA DE CISTOS DE PROTOZOÁRIOS

J. O. Coutinho *

A pesquisa de cistos de protozoários faz-se usualmente em fezes formadas, devendo-se dar preferência aos processos de enriquecimento. Temos adotado, em nossos trabalhos, o método recomendado por Faust e col. (1938), introduzido em nosso meio por Sacramento (1940) tendo, a sua eficácia, no diagnóstico das protozooses intestinais, sido confirmada por numerosos autores, principalmente pelos trabalhos de Amaral (1944) e outras investigações posteriores. Nesse processo de enriquecimento utilizam-se fezes passadas normalmente, de forma que o exame tem de ser feito em período de tempo relativamente curto, ou o material conservado em baixa temperatura quando não podem as fezes ser manipuladas imediatamente, mesmo assim o exame deve ser feito em 4 a 5 dias no máximo.

Essa técnica coprológica satisfaz plenamente os diagnósticos para a clínica, bem como os trabalhos de inquérito, quando o laboratório está ao alcance próximo da área trabalhada. Para contornarem-se essas dificuldades, em trabalhos de inquérito, têm-se lançado mão dos laboratórios móveis ou a conservação do material em câmaras refrigeradas, por tempo limitado; ambos os processos acarretam dificuldades de ordem administrativa e que só seriam solucionadas pela adoção de conservadores que garantissem a preservação do material para exame em tempo oportuno.

Cunha ¹ (1938) preconizou o uso da formalina para a conservação do material fecal. Rosenfeld ⁶ (1937) recomendou a formalina a 10% em solução fisiológica, adicionando-se uma parte de fezes a 2 a 3 partes do fixador. Amaral ¹ (1942) valeu-se dêsse fixador para a conservação de fezes recolhidas em zona rural, a pesquisa de cistos sendo feita posteriormente, pela técnica de centrífugo-flutuação no sulfato de zinco, segundo Faust e col. ⁵ (1938).

Recebido para publicação em 30-6-1956.

⁹ Trabalho da Cadeira de Parasitologia Aplicada e Higiene Rural (Prof. Paulo C. de A. Antunes) da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

^{*} Professor Adjunto da Cadeira de Parasitologia Aplicada e Higiene Rural da Faculdade de Higiene e Saúde Pública e Docente Livre da Cadeira de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Em nossas observações verificamos que a fixação da matéria fecal pelo formol acarretava alterações na morfologia dos cistos prejudicando, até certo ponto, o diagnóstico específico.

Sapero, Lawless e Strome ⁹ (1951) introduzem uma nova técnica para diagnóstico das parasitoses intestinais baseada na coloração e preservação do material. Sapero e Lawless ⁸ (1953) desenvolvem essa técnica denominando-a de "MIF" (Mertiolato-Iodo-Formalina), recomendando-a para a conservação e coloração do material destinado ao diagnóstico das parasitoses intestinais. Acharam êsses autores ser essa técnica de grande aplicação na conservação e coloração de ovos de helmintos, cistos e trofozóitos de protozoários intestinais.

O conservador empregado é uma solução estável de:

Água	25 0	cm^3
Mertiolato n.º 99 a 1:1000	200	cm ³
Formalina	25	cm³
Glicerina	5	cm ³

No momento de colocar as fezes no conservador adicionar 0,15 cm³ de lugol a 5% a 2,85 cm³ da solução estoque de mertiolato-formol-glicerina. Com o emprêgo dessas duas soluções obtem-se a conservação e a coloração dos ovos e cistos para diagnóstico. A utilização dessa técnica permite a conservação do material sem alterações morfológicas por largo período de tempo.

Posteriormente, Blagg, Schoegel, Mansur, Khalaf $^{\rm 3}$ (1955) empregaram a técnica de preservação e coloração recomendada por Sapero & Lawless $^{\rm 8}$ (1953), para os exames usaram a centrifugação em éter sulfúrico, designando essa técnica empregada como "MIFC" e que consta de:

- 1) Agitar bem os tubos contendo as fezes conservadas no "MIF".
- 2) Passar a suspensão de fezes em gase para um tubo de 15 ml.
- Adicionar 4,5 cm³ de éter sulfúrico resfriado para evitar evaporação, agitar o tubo, vigorosamente, tampando com rolha de borracha.
- 4) Remover a rolha e centrifugar por 1 minuto a 1.600 rotações; após a centrifugação formam-se 4 camadas no tubo-éter, detritos de fezes, "MIF" e sedimento onde se vão encontrar os cistos de protozoários e ovos de helmintos.
- 5) Desfazer o anel formado pelos detritos.
- 6) Eliminar todo o conteúdo do tubo com excessão do sedimento.
- 7) O sedimento é então examinado entre lâmina e laminula.

Blagg e col. 3 (1955) estudaram comparativamente, várias técnicas de exames de fezes, achando ser o "MIFC" a mais recomendada, pois revelava tanto os cistos como as formas trofozoíticas encontradas nas fezes.

Para a pesquisa de protozoários não incluiram a centrifugoflutuação em sulfato de zinco a 1.180 em suas comparações, o que fizeram em relação aos ovos de helmintos, mostrando ser o método de Faust e col. ⁵ (1938) inferior ao "MIFC", para todos os helmintos, enquanto o "Faust" revelava 26% dos positivos, o "MIFC" evidenciava 86%.

Empenhados, que estamos, em conseguir um processo de conservação de fezes que permita o seu transporte do campo para o laboratório, sem prejuizo para o diagnóstico específico de cistos de protozoários intestinais, iniciamos nossas observações com a finalidade de esclarecer o problema.

Verificamos de início que duas dificuldades se antepunham ao emprêgo das técnicas recomendadas por Sapero e Lawless ⁸ (1953) e por Blagg e col. ³ (1955). Sendo instável a solução de "MIF", havia necessidade de adicionar o lugol no momento em que eram juntadas as fezes ao conservador. Constituindo outro inconveniente o alto custo do Mertiolato n.º 99, a 1:1000 usado no "MIF", que no comércio é vendido por cêrca de Cr\$ 50,00, 120 g.

Contornamos o primeiro óbice modificando a técnica original. As fezes eram conservadas na solução de mertiolato-formol-glicerina e o lugol posto em contacto com o sedimento no momento do exame, constatando-se que essa modificação não alterava a estrutura dos cistos e permitia boa coloração, evitando-se a manipulação de 2 soluções no momento da conservação.

Quanto a segunda dificuldade, de natureza econômica, procuramos estudar os componentes da solução conservadora. Sendo o mertiolato um composto mercurial com 49,55% de Hg., de grande valor na fixação dos cistos, tentamos substituí-lo por outro composto da mesma origem. Utilizamos o mercúrio-crômo, composto que contém 26,72% de Hg. e de custo cêrca de 15 vêzes inferior ao do mertiolato.

Passamos a utilizar uma tintura de mercúrio-crômo a 2.1000 para obtermos uma concentração de mercúrio semelhante a que se obtinha usando o mertiolato.

O método que estamos empregando atualmente, consta em misturar as fezes recém-emitidas na proporção aproximadamente de 1 parte de fezes para 5-10 de solução conservadora, semelhante à preconizada por Sapero e Lawless 8 (1953), substituindo-se a tintura de mertiolato a 1:1000 pela de mercúrio-crômo a 2:1000.

O material assim conservado tem sido examinado e guardado no laboratório para exames posteriores; após 6 meses de preservação temos observado que os cistos e ovos de helmintos mantêm-se em condições satisfatórias para o diagnóstico específico.

As fezes conservadas na solução de mercúrio-crômo, formol e glicerina prestam-se para as técnicas de enriquecimento, sejam as de centrifugação em éter ou as de centrífugo-flutuação.

Embora não possamos ainda avaliar as vantagens em relação aos ovos de helmintos por termos usado material pouco adequado, temos observado que, os ovos de A. lumbricoides, T. trichiurus, Ancylostomidae, H. nana e Taenia sp. conservam-se em ótimas condições para exame posterior, sendo a referida solução boa conservadora para tais ovos. O mesmo não ocorre com o Schistosoma mansoni, pois os miracídios libertam-se, ràpidamente, em contacto com êsse conservador, prejudicando sensivelmente os resultados dos exames. As presentes observações baseam-se na utilização de fezes de 200 pacientes, que se mostravam positivas para cistos de qualquer protozoário intestinal, cujos resultados acham-se resumidos no quadro anexo onde estabelecemos as necessárias comparações.

Entre as 200 fezes examinadas pelo "Faust", utilizando-se material recém-emitido e pelo "MIFC" modificado surgiram 41 discordâncias, mas entre êsses resultados discordantes, 177 foram positivos para o "Faust" e 182 para o "MIFC" (modificado). As diferenças encontradas no método não são estatisticamente significantes, porque tais diferenças de positividade são apenas parciais. Encontramos maior discordância nos resultados para *Endolimax nana*; como se vê no quadro anexo, o "MIFC" revelou 9% a mais que o "Faust". Aplicando-se o teste de diferença de médias entre as duas proporções verifica-se diferença significante ao nível de 5% (k = 2,84), entretanto, no conjunto, como já vimos, os dois métodos têm pràticamente, as mesmas possibilidades para o diagnóstico dos cistos de protozoários, como ficou evidenciado.

Verificamos nesse estudo que é possível empregar-se o "MIFC" substituindo-se a tintura de mertiolato n.º 99 a 1:1000 pelo de mercúrio-crômo a 2:1000, reduzindo-se consideràvelmente o seu custo. O material conservado na solução de mercúrio-crômo-formol e glicerina presta-se para a aplicação das técnicas usuais de enriquecimento; foi-nos possível também demonstrar que se pode dispensar a associação do lugol no momento da conservação, para usá-lo, sòmente, após o material manipulado para exame.

A técnica recomendada por Blagg e col. 3 (1955), centrifugação em éter sulfúrico, é um processo muito rápido e de mais fácil execução, entretanto, torna-se de custo mais elevado em virtude da utilização do éter. Este óbice pode ser removido, conservando-se o material, como é aqui recomendado, fazendo-se depois a centrífugo-flutuação na solução de sulfato de zinco a 1.180, como preconizada por Faust e col. 5 (1938).

Pensamos dessa forma, com a introdução da solução de mercúrio-crômo-formol-glicerina), como conservadora de fezes, ter atingido um ponto de muita importância para a realização de inquéritos coprológicos, principalmente, no que se refere aos trabalhos de campo, afastados dos laboratórios especializados.

Comparação d	los resulta	dos de 20	00 exames	de	fezes,	de	indivíduos	positivos
para	qualquer	protozoá	rio, feitos	pelo	"Faus	st"	e "MIFC"	

Métodos empregados	Concor- dâncias entre "Faust" e "MIFC"		Resulta- dos pelo "Faust" e "MIFC"		Resulta- dos só pelo "Faust"		Resulta- dos só pelo "MIFC"		Diferen- ças entre "Faust" e "MIFC"	
Protozoários encontrados	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Entamoeba histolytica	58	29,0	71	35,5	7 0	35,0	71	35,5	1	0,5
Entamoeba coli	80	40,0	105	52,5	100	50,0	102	51,0	2	1,0
Endolimax nana	81	40,5	111	55,5	92	46,0	110	55,0	18	9,0
Iodamoeba butschlii	14	7,0	20	10,0	19	9,5	20	10,0	1	0,5
Giardia lamblia	63	31,5	85	42,5	81	40,5	82	41,0	1	0,5
Chilomastix mesnili	2	1,0	5	2,5	4	2,0	4	2,0	0	0,0

RESUMO

O Autor estuda a técnica do "MIFC" (mertiolato-iodo-formalina) recomendada na conservação e coloração de fezes para a pesquisa de ovos de helmintos e cistos de protozoários intestinais.

Introduz algumas modificações, substituindo a tintura de mertiolato a 1:1000 pela de mercúrio crômo a 2:1000 e recomendando o emprêgo do lugol após o preparo do material para exame.

Estuda comparativamente o "MIFC" modificado e o "Faust", através dos resultados obtidos em 200 exames realizados, e verifica que os dois métodos são semelhantes na prática. Acentua, ainda, que o material conservado na solução de mercúrio crômo-formalina presta-se para ser examinado pelas técnicas usuais de enriquecimento. Acha que o "MIFC" modificado é de grande aplicação nos inquéritos coprológicos em zona rural.

SUMMARY

The Author studies the techniques of the "MIFC" (merthiolate-iodum-formalin) commended in the preservation and coloration of the feces for research on helminth's eggs and cistus of intestinal protozoa.

Introduces some modifications, substituting the tincture of merthiolate at the rate of 1:1000 by that of the mercury-chrome at 2:1000 and commends the employment of lugol after the preparation of the material to be examined.

Verifies that, by studying comparatively both the duly modified "MIFC" and the "Faust", the results, obtained among 200 (two hundred) examens carried out, show that the two methods are equivalent in the practice. Accentuates also that the material preserved in the solution of mercury-chrome-formalin is apt to be looked into under the usual tecniques of enrichment. Considers that the modified "MIFC" is of large use in the coprological inquiries in the rural area.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Amaral, A. D. F.: Nota sôbre a incidência de portadores de cistos de E. histolytica, numa comunidade rural. Rev. Med. 26:49-57, out. 1942.
- Algumas contribuições do laboratório para o estudo da amebíase, 1944. Tese para docência — Fac. Med. Univ. São Paulo.
- 3. Blagg, E.; Schloegel, E. L.; Mansur, N. S. & Khalaf, G. I.: A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. Am. J. Trop. Med. 4:23-40, 1955.
- 4. Cunha, A. M. da: Protozoários intestinais das crianças do Rio de Janeiro. Sciencia Med., 6:103, 1928.
- Faust, E. C. et al.: A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. Am. J. Trop. Med. 18:169-183, 1938
- 6. Rosenfeld, G.: Pesquisa de amebas nas fezes. Rev. Clin. de São Paulo, 2:47-50, 1937.
- Sacramento, W.: Observações sôbre processos de enriquecimento de ovos e larvas de helmintos e de cistos de protosoários nas fezes, com especial referência ao método de Faust. Rev. Med. 24:67-73, dez. 1940.
- 8. Sapero, J. J. & Lawless, D. K.: The "MIF" stain-preservation technic for identification of intestinal protozoa. Am. J. Trop. Med. 2:613-619, 1953.
- 9. —; Lawless, D. K. & Strome, C. P. A.: An improved iodine-staining technique for routine laboratory diagnosis of intestinal protozoa. Science, 114:550-551, 1951.