

FACULDADE DE HIGIENE E SAÚDE PÚBLICA DA UNIV. DE SÃO PAULO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

(Diretor: **Prof. Dr. Paulo Cesar de Azevedo Antunes**)

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

(Diretor: **Prof. Dr. Samuel Barnsley Pessoa**)

AGLUTINAÇÃO DE TROFOZOITOS DE UMA ENDAMEBA DE VIDA LIVRE
(*E. MOSHKOVSKII*) POR SÔRO SANGUÍNEO HUMANO

RUBENS AZZI LEAL

Professor adjunto

e

A. DACIO F. AMARAL

Docente-livre e assistente

Em trabalhos anteriores (Amaral & Azzi Leal, 1948 e Azzi Leal & Amaral, 1950), comunicamos os resultados de investigações realizadas com a *E. moshkovskii*, ameba de vida livre, isolada de material de esgoto.

Julgamos de interesse ampliar nossos estudos sobre esse protozoário, em virtude de sua semelhança morfológica com a endameba patogênica do homem. E, assim, no presente trabalho, estudamos o poder aglutinante de soro sanguíneo humano sobre trofozoítos de cultura de *E. moshkovskii* Tshalaia, 1941.

MATERIAL E MÉTODO DE ESTUDO

O cultivo da *E. moshkovskii* era feito em meio líquido (Amaral, 1945), em temperatura ambiente. Usamos 2 cêpas, por nós isoladas de lodo digerido e de efluente clorado do esgoto de duas estações de tratamento na cidade de São Paulo.

As culturas, com 2 a 4 dias de crescimento, eram filtradas através tecido de algodão de malhas cerradas, com a finalidade de remover as partículas mais grosseiras. Centrifugava-se o filtrado a 1.500 r.p.m., durante 3 a 5 minutos, desprezando-se depois o sobrenadante. O sedimento era lavado e centrifugado por 2 vezes em soro fisiológico e os trofozoítos nêle existentes eram então usados para as provas de aglutinação.

O soro humano era obtido de portadores ou não de *E. histolytica*.

As provas eram realizadas em lâminas escavadas apropriadas, misturando-se, por meio de pequeno bastão de vidro, 0,1 cm³ de sôro e igual volume do sedimento da cultura tratada conforme já foi descrito. As lâminas eram colocadas na estufa a 37°C e, ao fim de 1 hora, observadas diretamente ao microscópio. O sedimento usado mostrava cerca de 100 trofozoítos por campo (objetiva 10, ocular 12). Nos testemunhos o sôro humano era substituído por solução fisiológica.

A aglutinação era considerada positiva quando se formavam conglomerados de 6 ou mais amebas, com raríssimas formas isoladas (microfotos n.ºs 1 e 2). Embora tivéssemos observado diferenças na intensidade da aglutinação que em títulos baixos formava grandes blocos de trofozoítos, neste trabalho não levamos em conta tais fatos, assinalando sempre as provas positivas por meio de uma cruz (+). Com a finalidade de verificar se havia relação entre poder aglutinante e o estado intestinal dos pacientes, todos eles foram cuidadosamente examinados, de acordo com o seguinte esquema: a) um exame, em fezes formadas, pelos processos de Faust e col. e da sedimentação; b) outro, após purgativo salino (sulfato de sódio), sendo o material examinado a fresco e também sob coloração pela hematoxilina férrica. As fezes de purgativo eram obtidas no próprio laboratório.

RESULTADOS

Nas provas preliminares executadas com sôro normal, não diluído, de 20 indivíduos, verificamos sempre aglutinação dos trofozoítos, ao fim de 5-10 minutos, seguida de lise completa dos mesmos, em 15-45 minutos. Com sôro inativado a 56°C, por 30 minutos, não havia desintegração dos corpos amebianos e a aglutinação perdurava ainda após 24 horas de permanência das lâminas no refrigerador (2 a 8°C), em temperatura ambiente ou na estufa a 37°C (em câmara úmida).

Diante desses resultados passamos a usar somente sôro inativado, em diferentes diluições, conforme se acha discriminado no quadro anexo, onde figura também o resultado dos exames de fezes dos pacientes doadores do sôro.

Foram observadas aglutinações em títulos variáveis, de 1:20 até 1:320. As lâminas, quando conservadas no refrigerador, de um dia para outro, mostravam positividade em diluições que, na véspera, estavam negativas (vide quadro anexo).

Consideramos a hipótese de que a variação do poder aglutinante pudesse estar ligada ao parasitismo dos doadores de sôro, pela *E. histolytica*. Entretanto, conforme se pode ver pelo quadro, não se observou relação entre os títulos da aglutinação e a presença da ameba patogênica nas fezes dos indivíduos estudados. Com efeito, os sôros dos 3 eliminadores de cistos de *E. histo-*

lytica aglutinaram a 1:20, 1:40 e 1:160. Pacientes não amebianos houve que aglutinaram a 1:320.

Nas lâminas testemunhas as amebas sempre permaneceram isoladas (microfoto n.º 3).

COMENTARIOS

A aglutinação de amebas de vida livre foi estudada por Zaubitzer (1901), Coca (1912), von Schuckmann (1920), que tentaram por meio dessa prova separar gêneros e espécies diferentes. Para consecução desse objetivo, imunizavam coelhos com culturas de amebas injetadas por via peritoneal ou venosa. Chegaram à conclusão de que, por meio dessa reação imunitária, era possível separar espécies. Heathmann (1932), com igual finalidade, estudou outras propriedades antigênicas de amebas de vida livre e da patogênica, injetando-as em animais. Concluiu que os organismos usados eram bons produtores de precipitinas e anticorpos fixadores do complemento e verificou semelhanças e dissimelhanças do ponto de vista imunitário entre a *E. histolytica* e as espécies de vida livre com as quais trabalhou. No que se refere à prova de aglutinação, essa autora apenas assinala que amebas de vida livre são naturalmente aglutinadas por soro de coelhos não inoculados previamente. Sellards (1911), pelo contrário, nesse animal, não conseguiu demonstrar aglutininas, mesmo após inoculação da ameba patogênica e de outras de vida livre.

Não encontramos na literatura compulsada investigações sobre o poder aglutinante de soro humano sobre amebas de vida livre. Por essa razão, nossas observações não podem ser comparadas às dos autores citados. É interessante assinalar que nossas pesquisas demonstram indubitavelmente a existência de uma aglutinina, no soro sanguíneo humano, para a *E. moshkovskii*. Não conseguimos, entretanto, nas condições de nosso estudo, estabelecer correlação entre o poder aglutinante do soro sobre essa endameba de vida livre e o parasitismo do doador pela endameba patogênica.

Os soros usados no presente estudo foram igualmente empregados em provas de aglutinação com trofozoítos de *E. histolytica*, o que constituiu objeto de outro trabalho (Amaral & Azzi Leal, 1952). Pudemos, assim, verificar que não são grandes as diferenças de comportamento das duas amebas (*E. moshkovskii* e *E. histolytica*) frente a soros ativos, pois, ao fim de 1 hora, os respectivos trofozoítos estão desintegrados. Com soro inativado, embora ambas as espécies sejam sempre aglutinadas, existe uma apreciável diferença nos títulos, pois enquanto a *E. moshkovskii* é aglutinada de 1:20 a 1:320, a *E. histolytica* o é geralmente em diluições menores, 1:1 até 1:40 (Amaral & Azzi Leal, 1952). Por outro lado, verificamos que a aglutinação da *E. moshkovskii*, com as diferentes diluições de soro inativado, perdura e se acentua ao fim de 24 horas, enquanto que os trofozoítos da *E. histolytica* são completamente desintegrados, em idênticas condições. Esses fatos apresentam grande interesse prático para o diagnóstico diferencial dessas amebas, dado que, morfológicamente, trofozoítos e cistos desses rizópodes são indistinguíveis.

CONCLUSÕES

1. Sôro sanguíneo humano, ativo, não diluído, aglutinou, em 5-10 minutos, trofozoítos de culturas de *Endamoeba moshkovskii* (ameba de vida livre). A aglutinação seguiu-se lise completa das amebas ao cabo de 15-45 minutos.

2. A mesma prova anterior, executada, porém, com sôro inativado mostrou aglutinação, em títulos que variavam de 1:20 até 1:320.

3. Não foi verificada associação entre os títulos de aglutinação e a presença da *E. histolytica* nas fezes dos pacientes doadores do sôro.

4. Comparando os resultados da presente investigação com os de outro trabalho no qual os autores estudaram a ação dos mesmos soros sôbre trofozoítos da *E. histolytica*, verificaram: a) que soros humanos ativos exercem sôbre ambas as amebas uma ação desintegradora; b) que os mesmos soros, inativados, aglutinam a *E. moshkovskii* em diluições mais elevadas (1:20 a 1:320) do que a ameba patogênica (1:1 a 1:40); c) que a aglutinação da *E. moshkovskii* perdura e se acentua ao fim de 24 horas, mantidas as lâminas na geladeira (2° a 8°C) em temperatura ambiente ou na estufa a 37°C, ao passo que, em idênticas condições, os trofozoítos da *E. histolytica* são destruídos.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

*Agglutination of "Endamoeba moshkovskii" trophozoites
(a free living organism) by human blood serum.*

1) Trophozoites from cultures of *E. moshkovskii* (a free living ameba) were agglutinated by undiluted normal human serum; the agglutination was followed by the disintegration of the amebae in 15 to 45 minutes.

2) With inactivated serum, the agglutinations were observed in titres from 1:20 up to 1:320. When kept in the refrigerator, for 24 hours, the agglutination increased and appeared in titres which had been negative the day before.

3) There appears to be no correlation of this agglutination phenomenon with infection with *E. histolytica*.

4) In a comparison of the results obtained in the present investigation with the one in which the authors (Amaral & Azzi Leal, 1952) studied the action of the same sera on trophozoites of *E. histolytica*, they observed the following facts: a) active human sera have a disintegrating action on both amebae; b) the same sera, inactivated, agglutinates the free living amoeba in higher titres (1:20 up to 1:320) than in *E. histolytica* (from 1:1 up to 1:40); c) the agglutination of *E. moshkovskii* persists and increases after 24 hours, keeping the slides at room temperature, in refrigerator (2-8°C) or in incubator (37°C), while in identical conditions, the trophozoites of *E. histolytica* are destroyed.

AGLUTINAÇÃO DE TROFOZOITOS DE *E. MOSHKOVSKII* POR SORO HUMANO INATIVADO. LEITURA APÓS 1 HORA DE ESTUFA A 37°C

Paciente	Diluição do soro								Resultado do exame de fezes
	1:1	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	
E. P.	+	+	+	+	+	+	—	x	<i>E. histolytica</i> , <i>E. coli</i> , <i>D. fragilis</i> .
A. C. L.	+	+	+	±	—	—	—	x	<i>E. histolytica</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. nana</i> .
E. S.	+	+	+	+	+	+	+	x	<i>E. nana</i> , <i>C. mesnili</i> .
J. J. L.	+	+	+	+	+	±	—	x	<i>T. trichiurus</i> .
J. C.	+	+	+	+	±	±	—	x	<i>E. histolytica</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. nana</i> , <i>G. lamblia</i> , <i>S. stercoralis</i> .
A. A. D.	+	+	+	—	—	—	—	x	Negativo.
J. S.	+	+	+	+	+	+	— *	x	<i>E. coli</i> , Ancilostomídeo.
E. S.	+	+	+	+	+	± *	± *	x	<i>E. coli</i> , <i>I. bütschlii</i> , <i>G. lamblia</i> , <i>T. hominis</i> , <i>S. stercoralis</i> , <i>T. trichiurus</i> .
M. F. H.	+	+	+	+	+	+	— *	— *	<i>T. trichiurus</i> .
M. O. A.	+	+	+	+	+	+	+	— *	<i>E. coli</i> , <i>E. nana</i> , <i>T. hominis</i> , Ancilostomídeo.

+ Aglutinação positiva.

± Aglutinação duvidosa.

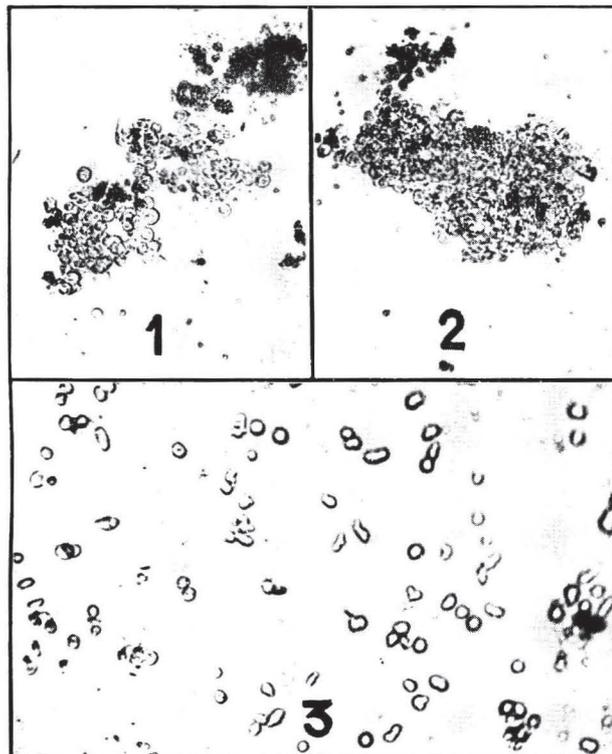
— Aglutinação negativa.

x Não executado.

* Aglutinado somente após 24 hs. no refrigerador.

BIBLIOGRAFIA

- Amaral, A. D. F. — 1945. — Nova modificação em meio de cultura para *Endamoeba histolytica*. An. Fac. Med. Univ. S. Paulo, 21:175.
- Amaral, A. D. F. & Azzi Leal, R. — 1948. — Sobre uma endameba semelhante à *Endamoeba histolytica*, encontrada em material de esgoto. Contribuição apresentada ao VII Congr. Brasil. de Higiene (S. Paulo, dez. 1948). Rev. Paul. Med., 34 (3):173-76, 1949. Anais do VII Congr. Brasil. de Hig., vol. II, pg. 847-850. S. Paulo.
- Amaral, A. D. F. & Azzi Leal, R. — 1952. — Pesquisa do poder aglutinante de soro sanguíneo humano sobre trofozoítos de *Endamoeba histolytica*. Rev. Med. e Cir. São Paulo, 11(5).
- Azzi Leal, R. & Amaral, A. D. F. — 1950. — Novos estudos sobre amebas encontradas em esgoto, com referência especial a uma endameba (*E. moshkovskii*) semelhante à *Endamoeba histolytica*. Arq. Fac. Hig. e S. Púb. Univ. S. Paulo, 4(2): 125-133.
- Coca, A. F. — 1912. — Separation of protozoan species by means of immunity reactions. Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap. (Orig.), 12:127-133.
- Heathman, L. — 1932. — Studies of the antigenic properties of some free-living and pathogenic amebas. Am. J. Hyg., 16:97-123.
- Sellards, A. W. — 1911. — Immunity reations with amoebae. Philippine J. Sc., 6: 281-298.
- Von Schuckmann, W. — 1920. — Serologische Untersuchungen an Kulturamoben. Klin. Wchenschr., 1 vii:545-547.
- Zaubitzer, H. — 1901. — Studien über eine dem Strohinfus entnommene Amöbe. Arch. f. Hyg., 40:103-141.



Microfotos 1 e 2. — Aglutinação de trofozoitos de *E. moshkovskii* com sôro humano inativado. Diluição 1:1. (x200).

Microfoto 3. — Testemunho. Trofozoitos + sôro fisiológico. Ausência de aglutinação. (x200).