

Rubens Azzi Leal

INTRADERMO-REAÇÃO NA AMEBÍASE

Contribuição para o seu estudo

Tese apresentada à Comissão Julgadora do concurso para provimento do cargo de Professor Catedrático de EPIDEMIOLOGIA E PROFILAXIA GERAIS E ESPECIAIS, da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo.



São Paulo

1953

A MEMÓRIA DE MINHA MÃE

ÍNDICE

	Página
INTRODUÇÃO	5
CAPÍTULO I	
EVOLUÇÃO E ESTADO ATUAL DOS CONHECIMENTOS SÔBRE A INTRADERMO-REAÇÃO NA AMEBÍASE	9
CAPÍTULO II	
MATERIAL E MÉTODO DE ESTUDO	29
1 - Antígenos:	
a) Considerações gerais	29
b) Culturas de <i>Endamoeba histolytica</i> ...	32
c) Culturas de <i>Endamoeba moshkovskii</i> ...	35
d) Técnica para o preparo dos antígenos de prova	35
e) Antígeno testemunho	38
2 - Técnica das intradermo-reações e leitura de seus resultados	41
3 - Diagnóstico coprológico da amebíase	44
4 - Material humano	48
CAPÍTULO III	
ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS EXPERIMENTAIS	50
1 - Análise estatística	50
2 - Comentários	68
CAPÍTULO IV	
CONCLUSÕES	74
BIBLIOGRAFIA	76

I N T R O D U Ç Ã O

Consagrando o melhor de nossa atenção aos problemas referentes à amebíase, capacitamo-nos, desde há muito, que seu estudo epidemiológico receberia valioso impulso se dispuséssemos de processo prático que permitisse o diagnóstico acurado dessa moléstia. Com efeito, a evidência da *Endamoeba histolytica* nas fezes, método de eleição para a diagnose da forma mais comum da amebíase, a intestinal, exige laboratorista com longo tirocínio e, no dizer de Faust (1942), treinado intensamente pelo menos durante 6 meses. Craig (1948) afirmava que os erros diagnósticos são de tal monta que "seria incapaz de acreditar nêles, se não os tivesse visto". Considere-se, a par disso, que a eliminação dos cistos de *E. histolytica* se faz irregularmente, de forma que um único exame de fezes formadas revela apenas fração dos parasitados, variável de acôrdo com o método adotado, mas, via de regra não superior à metade dêles. Nos casos negativos, a repetição dos exames se faz necessária, 2, 3 ou mais vêzes. A administração de purgativo salino melhora sensivelmente o rendimento do exame coprológico único, mas tanto essa prática como a de repetição dos exames, só dificilmente podem ser executadas com finalidades clínicas, e, nunca, em estudos epidemiológicos, em massa. Este estado de coisas explica o modo de pensar de D^o Antoni (1949): "Our present means of diagnosis are cumbersome, time consuming, and utterly impractical for mass test", bem como o de Faust (1952) expresso nas palavras: "The lack of uniformity in the diagnosis of amebiasis is apparent in both the clinical and epidemiologic fields".

Outros meios diagnósticos têm sido ensaiados, tais como a cultura da endameba, inoculação em animais sensíveis, retossigmoidoscopia, provas imunológicas (fixação de complemento, precipitação, aglutinação), etc. Essas

tentativas indicam não só puro interesse científico pelo assunto, mas, sobretudo, trazudem a insatisfação oferecida pelo exame coprológico e o conseqüente desejo de encontrar método prático e seguro que possibilite o diagnóstico da amebíase, elemento de fundamental importância para o estudo de sua epidemiologia: "... o diagnóstico preciso das doenças é", como bem observa Barros Barreto ... (1951), "o primeiro requisito para que se lhes possa fazer o estudo epidemiológico".

Nessa ordem de idéias, consideramos a hipótese de se aplicar, como meio diagnóstico da infecção amebiana, antígeno específico, por via intradérmica, tal como se faz com êxito em numerosas moléstias infecciosas. Como exemplo, citemos apenas a chamada reação de Montenegro, prova cutânea de alergia infecciosa que, permitindo o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana, tem contribuído de forma significativa para o estudo clínico e epidemiológico dessa protozoose. Cuidadosa revisão da literatura mostrou-nos que, na amebíase, já foi aplicada prova semelhante, com finalidade diagnóstica, pelo investigador italiano Scalas (1923). Os resultados animadores então obtidos e o renome do autor que já havia dado publicidade a valioso trabalho sôbre fixação de complemento na mesma moléstia (Scalas, 1921), faziam crer que se multiplicassem as observações nesse setor. Entretanto, sômente em 1932 foi o assunto retomado por Spector que concluiu pela inadequação do método ao diagnóstico da amebíase; a semelhante conclusão chegou também Secret ... (1952).

Outros estudos existem, ainda, referentes ao emprêgo da intradermo-reação em animais inoculados com diferentes amebas; os resultados, neste domínio, são, de forma geral, encorajadores.

Sendo tão numerosos os trabalhos sôbre amebíase, é verdadeiramente surpreendente que a literatura existente sôbre a intradermo-reação nessa protozoose seja tão pobre e inconclusiva. Como veremos pormenorizadamente no texto desta tese, subsistem dúvidas fundamentais sôbre a matéria e desconhece-se o real valor da prova como meio

diagnóstico da infecção amebiana. Como consequência é ela considerada com reserva ou mesmo omitida pelos mais eminentes autores. "... such tests have not extensive trial" (Culbertson, 1941). Este mesmo autor representa a prova cutânea na amebíase com a seguinte notação: + (?). E sem dúvida ainda é essa sua atual conceituação. "In protozoan infestations skin tests have been less useful. The only instance to be mentioned is leishmaniasis..." (Chase, 1952).

Forçoso é então reconhecer que se tornam necessários novos estudos para a fixação do real valor da intradermoreação no diagnóstico da amebíase. A matéria, sobre ser de importância pela possibilidade de vir a contribuir para o estudo epidemiológico dessa moléstia, é interessante e atraente: "No field of parasitic immunity offers more promise of interesting practical and theoretical results than does the study of various skin reactions associated with infection" (Taliaferro, 1929). Embora compartilhando da opinião dêsse reputado autor, devemos levar em consideração que, no particular, a natural complexidade da matéria e os poucos conhecimentos sobre ela existentes tornam pouco promissoras para o pesquisador as perspectivas de êxito. Mesmo assim, por termos em vista a importância de que se reveste o assunto, como já ficou evidenciado nas considerações expendidas, resolvemos empreender seu estudo, certo de que os dados e as observações resultantes de indagações como a que pretendemos levar a cabo é que permitirão no futuro a solução definitiva do problema.

No presente trabalho, em que apresentamos os resultados até agora obtidos, restringimo-nos à parte fundamental do assunto, isto é, à pesquisa no homem da intradermoreação à injeção de antígeno amebiano e sua relação com a presença da *E. histolytica* nas fezes. Problemas correlatos preexistentes e outros que já surgiram com o desenvolvimento desta investigação constituem um amplo programa para ulteriores pesquisas.

Para facilidade de exposição o presente estudo será dividido nos seguintes capítulos.

- I - Evolução e estado atual dos conhecimentos sôbre a intradermo-reação na amebíase.
- II - Material e método de estudo.
- III - Análise e interpretação dos dados experimentais.
- IV - Conclusões.

* *

*

CAPÍTULO I

EVOLUÇÃO E ESTADO ATUAL DOS CONHECIMENTOS SÔBRE A INTRADERMOREAÇÃO NA AMEBÍASE

Robert Koch, ao demonstrar a reatividade alterada dos tecidos do animal tuberculoso ao germe da doença e aos seus produtos metabólicos (tuberculina), estava abrindo novo e promissor campo - o da alergia infecciosa - para o estudo das moléstias infecto-parasitárias.

No homem e nos animais, o estado de alergia infecciosa pode aparecer, naturalmente, como consequência de infecção, ou ser induzido pela introdução no organismo de germes vivos ou, excepcionalmente, de germes mortos ou de produtos de germes.

O reconhecimento desse estado se faz mais frequentemente, pela pesquisa da reação cutânea, que se mostra então modificada à injeção intradérmica dos agentes alergizantes.

Se adotarmos a idéia dominante de que tal reação seja consequência da união do antígeno com seu correspondente anticorpo *in vivo*, será lícito admitir que todos os agentes infecciosos que estimulem a produção de anticorpos possam criar o estado alérgico. Esta concepção tem servido de base para o largo emprego das provas alérgicas

cutâneas, o que vem contribuindo de forma altamente expressiva para o estudo clínico e epidemiológico de moléstias as mais diversas, evidenciando-se a infecção no presente, ou o contato do organismo com germes ou seus produtos, no passado, pôsto que o estado alérgico pode persistir mesmo após ter cessado o estímulo alergizante.

A alergia infecciosa, melhor estudada na tuberculose, tem sido igualmente evidenciada em outras doenças, tais como a linfogranulomatose inguinal (vírus), tifo epidêmico (rickettsia), brucelose (bactéria), tricofitias (cogumelo), leishmaniose (protozoário), filariose (helmintho), para citar apenas algumas de agentes etiológicos pertencentes a grupos taxonômicos diversos.

* * *

*

Na amebíase, a possibilidade de êxito da intradermo-reação (que doravante, para facilitar, representaremos por I R) estaria, como no caso de outras doenças infecto-parasitárias, na dependência da capacidade de seu agente estimular a formação de anticorpos específicos.

Os protozoários e demais parasitas que vivem na luz intestinal, pela falta de contato mais íntimo com os tecidos do hospedeiro, não estimulam a produção de anticorpos ou o fazem fracamente (Culbertson, 1951). Pelo contrário, a *Endamoeba histolytica* (que será representada por *E h*), parasita tissular, lesando a mucosa e penetrando, por vêzes, profundamente na parede do intestino grosso, provocaria formação de anticorpos e poderia determinar alergia cutânea revelável pela injeção de quantidades adequadas de antígeno específico.

Será oportuno, entretanto, lembrar que o assunto não é assim tão simples e comportaria na verdade extensas considerações.

Existem fatos ponderáveis indicados particularmente na literatura européia que fazem crer na possibilidade de a

E h manter-se como comensal na luz do intestino como o faz a *Endamoeba coli*, por exemplo. Essa idéia tornou-se bem conhecida e grangeou muitos adeptos principalmente por ter sido defendida por um parasitologista com o renome e a projeção de Brumpt (1949). Este autor estabeleceu características de ordem morfológica que permitiriam distinguir as formas comensais das patogênicas, agentes da amebíase. Além disto a observação de que a presença de *E h* nas fezes não se acompanha por vêzes de qualquer perturbação tem servido de apóio para aquêles que defendem a possibilidade de viver o referido protozoário na luz intestinal.

O problema é atraente e sua solução desde há muito vem sendo buscada por pesquisadores que têm estudado exaustivamente, do ponto de vista morfológico, biológico e imunológico, amostras de *E h*, oriundas de pacientes com e sem sintomatologia. Especial atenção tem-se atribuído ao tamanho da ameba e à flora de associação. Entretanto, até o momento, não foi dada a última palavra sôbre o assunto, sempre atual por sua importância científica, clínica e epidemiológica.

Embora acreditemos que maiores razões assistem àquelles que admitem a patogenicidade obrigatória da *E h*, uma análise mais pormenorizada da questão foge aos objetivos de nosso trabalho. De fato, para nós, o que importa, em suma, é saber que o poder antigênico da *E h*, ligado certamente à sua capacidade de lesar os tecidos, foi estabelecido há cerca de 40 anos, desde quando Izar (1914) verificou a presença de anticorpos fixadores do complemento no sôro sanguíneo de 5 pacientes e de 3 gatinhos infectados com essa ameba e negatividade da prova em indivíduos não parasitados pela *E h*.

Scalas (1921) em casos de disenteria amebiana configura a observação de Izar.

O assunto só voltou a ser tratado por Craig que a partir de 1927 deu publicidade a vários trabalhos que contribuíram de forma expressiva para o conhecimento da prova de fixação de complemento no diagnóstico da amebíase.. (Craig, 1948).

Outros autores, em animais infectados experimentalmente com a *E h* (Wagener, 1924; Craig & Kagy, 1933, etc.) ou com ela injetados por via parenteral (Heathman, 1932; Mendez, 1932, etc.) evidenciaram igualmente anticorpos específicos.

Tais verificações deveriam levar, naturalmente, à prática de provas intradérmicas, pois a produção de anticorpos pode, embora não necessariamente, acompanhar-se de estado alérgico demonstrável pela reação cutânea ao agente da doença e seus produtos, a qual, já dissemos, é concebível, em última análise, como resultado da união antígeno / anticorpo *in vivo*.

Foi certamente esta esta ordem de idéias que levou Scalas em 1923 a experimentar a I R no estudo da amebíase. Aliás, a aplicação desta prova cutânea ocorreu-lhe em 1921, ao verificar a possibilidade de, por meio dos anticorpos fixadores do complemento, diagnosticar essa protozoose. Cabe portanto a êsse pesquisador italiano o mérito de ser o primeiro a tentar a reação intradérmica na amebíase. Útil e indispensável por isso o conhecimento pormenorizado do seu trabalho pioneiro (Scalas, 1923).

O antígeno era preparado com material de casos agudos de acôrdo com a seguinte técnica: a 30 g de muco e fragmentos de mucosa intestinal ricos em amebas, obtidos de fezes humanas diarréicas, recentemente eliminadas, adicionava 50 ml de solução fisiológica. Em frasco com rolha de esmeril contendo pérolas de vidro, a mistura era mantida em estufa a 37° C durante uma semana, sendo agitada várias vezes por dia. Após passagem em papel de filtro e vela Berkefeld conetada a uma trompa de água, obtinha líquido límpido, o antígeno, que era descolorado com carvão animal e esterilizado por aquecimento descontínuo. Seu uso se fazia até um mês após a preparação. A prova era executada pela injeção intradérmica de 0,25 ml do antígeno na face anterior do antebraço. O contrôle, feito pela inoculação em outro braço de igual volume da solução de cloreto de sódio a 0,85%. Suave massagem assegurava rápida absorção do líquido. A observação era feita de hora em hora. Nas reações positivas já ao fim de uma hora via-se uma elevação implantada no centro de uma zona, de colorido róseo, com 5 a

6 cm. de diâmetro. Os sinais subjetivos consistiam em prurido e calor, sem dor. Não havia linfo-adenite e nem febre ou outras perturbações gerais. Ao fim de 1 a 3 dias no máximo, a reação desaparecia e não deixava vestígios. Nos casos negativos, os fenômenos se limitavam a uma área hiperêmica punctiforme.

Scalas empregou a prova em 32 indivíduos, cuidadosamente selecionados, dentre os quais 9 apresentavam a endameba patogênica nas fezes. Todos esses 9 pacientes mostraram reação cutânea positiva. Nos restantes 23 pacientes, não amebianos, a I R foi sempre negativa; deste grupo, 5 eram sãos, 11 apresentavam moléstias várias e 7 enterocolite não amebiana.

Baseado nessas observações, Scalas afirma que é possível, na amebíase intestinal, obter-se, com antígeno adequado, I R positiva de caráter específico. Deve-se ainda assinalar que a intensidade das reações guardava relação com o estado clínico da amebíase. Fortemente positiva nos casos agudos, era leve ou fugaz nos crônicos. Nestes últimos, nos quais os cistos nas fezes são de difícil encontro e reconhecimento, a prova encontraria, no dizer de Scalas, sua maior aplicação.

Seria natural que o trabalho de Scalas chamasse a atenção dos estudiosos e que se fizesse pronto reexame do problema e ampla aplicação da prova cutânea no diagnóstico da amebíase. A julgar, entretanto, pela literatura, o trabalho em aprêço não teve a repercussão e a aceitação a que fazia jus, não só pela relativa simplicidade do método e pelos sugestivos resultados obtidos com seu emprêgo, como ainda pelo renome do autor que 2 anos antes, como já vimos, havia publicado valioso trabalho (Scalas, 1921), ampliando o clássico estudo de Izar (1914) sobre a fixação do complemento na infecção amebiana.

A obtenção do antígeno deveria constituir a maior, se não a única dificuldade para que se fizesse o reestudo da I R, pois o material para seu preparo, fezes recentemente eliminadas por paciente com disenteria amebiana aguda, nem sempre pode ser conseguido com facilidade como observa o próprio Scalas. As culturas de *E h* poderiam tornar-se fon

te de substância antigênica e afastar êsse óbice. Tentadas por vários autores, dentre os quais Fajardo (1896), no Brasil, só foram elas obtidas, provavelmente, por Cutler (1918). Ao tempo, porém, em que Scalas publicou seu trabalho, 1923, a cultura não se fazia satisfatoriamente. Foi só 2 anos mais tarde que Boeck & Drbohlav (1925) descreveram um meio à base de ôvo, no qual se obtém crescimento e xuberante da ameba patogênica.

Era de se esperar que o cultivo da *E h*, podendo-se constituir em fonte apreciável de material para o preparo de antígeno, viesse contribuir de pronto para que a prova cutânea de Scalas fôsse devidamente considerada. Tal porém não se deu. Com efeito, somente anos depois Spector (1932), estudando métodos diagnósticos da amebíase, comparou o valor da cultura com o de provas imunológicas, entre as quais inclui a I R.

No preparo de antígeno para a execução da prova, essa autora lançou mão de culturas de *E h* tratando-as pelas 3 diferentes formas que passamos a enumerar sumariamente.

1) - Sedimento lavado de 7 cêpas de *E h* recebia igual volume de solução de Coca (*). Essa mistura permanecia muitos dias na estufa a 37,5° C, sendo aquecida durante 1 hora, a 60° C, diariamente. Como nessas condições os esporos de *Clostridium perfringens* permanecessem vivos, o extrato era passado pelo filtro Seitz.

2) - Sedimento de cultura, lavado e dessecado, era pulverizado em gral estéril e depois diluído na proporção de 1:100 em solução de Coca, sendo a extração do antígeno feita na geladeira durante 2 dias. Após centrifugação, o sobrenadante era filtrado em Seitz.

3) - Sedimento de cultura, lavado, era tratado com 7/8 partes de álcool absoluto, permanecendo o material na estufa por 15 dias, sendo frequentemente agitado. O pó assim obtido era diluído em solução de Coca na proporção de 1:100. Após filtração em Seitz, o antígeno estava pronto para ser empregado.

	NaCl	0,7	%
(*) Formula da solução de Coca:	NaHCO ₃	0,005	%
	Fenol	0,4	%

Finalmente um antígeno para contróle era obtido, unicamente com os germes aero e anaeróbios existentes nas culturas de amebas. O meio, a extração, bem como as demais operações adotadas para o preparo do antígeno testemunho, eram os mesmos do antígeno amebiano, inclusive a filtração. Para os 4 antígenos, a esterilidade era comprovada para os germes aero e anaeróbios.

Em experiências preliminares, Spector verificou que o 1º antígeno forneceu os melhores resultados. O extraído pelo álcool, o de nº 3, não apresentava poder antigênico. Em seu trabalho figuram apenas os dados obtidos com o de nº 1, o melhor.

Para a execução da prova, injetava, 0,1 ml intradérmicamente na face anterior do antebraço, fazendo o contróle pela injeção do mesmo volume do antígeno testemunho. Lia os resultados após 20 minutos, 24, 48 e 72 horas. Um número muito reduzido de pacientes mostrou reação imediata, ao fim de 20 minutos, enquanto que em alguns outros ela somente se positivou ao fim de 24 horas. A intensidade das reações era variável, indo desde ligeira vermelhidão até forte eritema com edema e hemorragia, permanecendo por 48 a 72 horas; nunca houve distúrbios gerais.

Foram estudados 157 indivíduos. Os resultados estão apresentados no quadro seguinte.

(Ver quadro na página seguinte)

Dentre os 157 pacientes usados para a prova cutânea e apenas 4 apresentavam amebíase. Os 153 indivíduos dados como livres de infecção amebiana apresentaram com os 2 antígenos empregados, o de prova e o testemunho, tôdas as combinações de reação possíveis, como se pode verificar no quadro acima. A conclusão a que a autora chegou de que a referida prova cutânea não se presta para o diagnóstico da amebíase é destituída de fundamento científico, pois a análise estatística de seus resultados, indispensável para qualquer pronunciamento autorizado em estudo dessa natureza, não foi feita; aliás, os dados disponíveis não se prestavam mesmo a uma análise satisfatória, em vista da natural impropriedade da amostra na qual, entre 157 pa-

CORRELAÇÃO ENTRE INFEÇÃO PELA E. HISTOLYTICA

E REAÇÃO CUTÂNEA TARDIA

(Seg. Spector, 1932)

INFEÇÃO PELA E. HISTOLYTICA	REAÇÕES CUTÂNEAS				TOTAL
	Prova + Test. -	Prova + Test. +	Prova - Test. -	Prova + Test. +	
Positivo.: Disenteria	2	-	-	-	2
Positivo.: Portador	-	2	-	-	2
Negativo	6	27	94	26	153
TOTAL	8	29	94	26	157

cientes, sòmente 4 apresentavam *E h* nas fezes. Considere-se ainda que o diagnóstico era estabelecido por meio de cultura e de exame de fezes sem enriquecimento, critério que teria deixado de revelar casos de amebíase em número suficiente para modificar os resultados obtidos. Embora não sejam fornecidos pormenores sòbre a natureza da amostra estudada, é sugestivo, e de certa forma confirma essa nossa hipótese, a baixa prevalência encontrada pela referida autora, pois apenas 4, entre 157 pacientes, estavam infectados pela ameba patogênica. Mesmo que se deixe de levar em conta êste fato, permanecem válidas as outras objeções levantadas, e, portanto, o mérito da I R como meio de diagnóstico da amebíase não pode ser julgado pelo trabalho de Spector.

Recentemente, é feita nova tentativa de diagnóstico da amebíase por meio da prova intradérmica, por Secret... (1952).

Êste autor francês utilizou como antígeno o conteúdo de abscesso amebiano do fígado, obtido durante uma intervenção cirúrgica. Bacteriológicamente estéril, êste material seria mais adequado para a feitura da I R do que o de cultura de *E h* que sempre se faz na presença de germes capazes de acarretar falsas reações. O conteúdo do abscesso, muito denso, era diluído com sôro fisiológico e em seguida tindalizado pelo aquecimento durante uma hora a 56° C, 3 dias consecutivos.

Dez pacientes com amebíase (5 com forma *histolytica*, 2 com forma *tetragena* e 3 eliminadores de cistos) foram injetados com 0,2 ml do antígeno no derma do antebraço. No ponto da injeção aparecia imediatamente uma pápula urticárfirme esbranquiçada, sem outra reação local de eritema ou edema, pápula que desaparecia ao fim de 15 minutos. O contrôle foi efetuado pela injeção da mesma substância antigênica em 10 pacientes livres de infecção amebiana e os resultados foram semelhantes aos verificados nos indivíduos infectados.

Redundou, portanto, em insucesso, a experiência de Secret no que concerne à possibilidade de diagnóstico da amebíase por meio da I R. O autor acredita que seus resultados indicam que a amebíase é uma infecção sem reação imunitária geral ou de hipersensibilidade cutânea, con

trariamente ao que ocorre em certas outras moléstias infecciosas. A ausência de anticorpos explicaria a longa evolução da moléstia e a negatividade da I R.

Em resumo, foram êsses os três únicos trabalhos, por nós encontrados na literatura compulsada, nos quais a I R era executada no homem. No primeiro dêles (Scalas, 1923) é atribuído valor à reação como método de diagnóstico da amebíase. Spector (1932) e Secret (1952) chegam porém a conclusões opostas, de sorte que no momento atual ignoramos a verdadeira significação da referida prova no estudo da infecção amebiana. Será oportuno considerar que os aludidos autores experimentaram antígenos amebianos elaborados com material diverso. Assim, Scalas empregou fezes disentericas, Spector culturas de *E h* e Secret, conteúdo de abscesso amebiano do fígado. Mesmo que se deixe de tomar em conta outros fatores, somente a diversidade da substância antigênica levar-nos-ia à natural pressuposição de que os resultados não deveriam ser concordantes, dado o papel de primordial importância desempenhado em estudos imunológicos pelo antígeno, extremamente sensível às menores variações de técnica e do material empregados em seu preparo. Foi mesmo em vista de reconhecer-lhe a relevância que descrevemos com pormenores as manipulações adotadas pelos autores citados, em sua preparação

* * *

*

A I R foi também estudada em animais experimentalmente infectados ou injectados por via parenteral com *E h*.

Alguns autores ensaiaram ainda a prova intradérmica com substância antigênica de amebas outras que não a *E h*. Esta prática estaria naturalmente justificada desde que se demonstrasse capacidade antigênica naqueles organismos, pois, já vimos, a I R seria consequência da união antígeno/anticorpo *in vivo*.

É evidente que no caso de amebídeos de vida livre a antigenicidade só poderia ser conhecida introduzindo-os por via parenteral em animais e pesquisando posteriormente a presença de anticorpos. Foi efetivamente êsse o processo adotado pelos autores que em seguida citaremos. Será oportuno

tuno, porém, assinalar, antes disto, que, em geral, os estudos imunológicos com amebas de vida livre precederam os feitos com a *E h*, certamente por serem aquelas pouco exigentes biologicamente, desde há muito cultivadas em laboratório, constituindo fácil material de estudo, ao passo que a ameba patogênica somente a partir de 1925, como vimos, foi obtida em cultura, de forma satisfatória.

São relativamente antigas as investigações sobre a capacidade antigênica de protozoários de vida livre e particularmente de amebídeos. Zaubitzer (1901) verificou que o sêro sanguíneo de animal injetado com *Vibrio comma* aglutinava, ainda que não especificamente, amebas que cresciam juntamente com aquêl germe. Rössle (1905), injetando coelhos e cobaias com os infusórios *Paramecium caudatum* e *Glaucocystis scintillans*, observou que o sêro dos animais adquiria o poder de imobilizar e matar aquêles protozoários. Coca (1912), injetando em coelhos amebas de vida livre não classificadas e designadas simplesmente como "Reed" e "Proteus", evidenciou, por meio de provas de fixação de complemento e de aglutinação, não só a capacidade antigênica dêstes organismos como sua diversidade do ponto de vista imunológico. Von Schuckmann (1920) e Michaelis (1930) verificaram igualmente a produção de anticorpos em animais injetados com amebas de vida livre, sendo que êste último empregou em seus experimentos formas císticas.

Tais investigações, comprovando que diferentes protozoários de vida livre possuíam poder antigênico, constituíam base científica que autorizava, tal como ocorria para o caso da *E h*, a execução de provas intradérmicas com antígenos preparados a partir daqueles organismos.

Veremos a seguir como vários autores se ocuparam, efetivamente, da prática da I R em animais com substância antigênica de *E h* ou de outras amebas. Vale assinalar, desde logo, que na maioria dêstes estudos aparecem certos problemas correlatos; a êles só se fará aqui menção se imprescindível às finalidades que temos em vista.

Parece ter sido Sellards (1911) o primeiro investigador a tentar a I R com antígeno amebiano em animais.

Êsse autor estudou do ponto de vista imunológico 4 amebas morfologicamente distintas. Duas foram isoladas de fezes de pacientes disentéricos. As outras duas, de vida

livre, foram isoladas de água de um rio e de infusão de feno. Sellards, considerando cautelosa e acertadamente que seria difícil classificar e identificar com precisão tais rizópodes, nomeia-os simplesmente por meio de letras, A, B, C e D. Essas amebas foram cultivadas em associação com *Serratia marcescens* em meio sólido à base de ágar e extrato de carne.

O autor usou em suas experiências coelhos injetados repetidamente com as referidas amebas vivas e *S. marcescens* suspensos em água. As primeiras duas ou três injeções eram feitas por via endovenosa, e as demais por via peritoneal. Cobaias foram, também por vezes, injetadas com culturas de amebas mortas pelo calor e incluídas nos estudos de aglutinação e I R.

Não foi possível evidenciar no sôro de animais imunizados a presença de precipitinas e aglutininas.

Sellards realizou ainda em coelhos e cobaias provas intradérmicas em épocas variáveis de duas semanas até seis meses após a primeira injeção imunizante de amebas e *S. marcescens*.

Como antígeno, nessas provas, empregou o seguinte material:

- 1) cultura de 24 horas emulsionada em água, triturada com areia e, após centrifugação, filtrada em óxido de magnésio;
- 2) simples emulsão de cultura de 24 horas em solução fisiológica.

Observou o A. que 12 a 18 horas após a injeção intradérmica do antígeno aparecia, nos animais, edema e vermelhidão local, especialmente com o antígeno n.º 2 que por vezes determinava ainda supuração. A diferença de reação entre animais imunizados e normais era inconstante e insignificante, parecendo, entretanto, que nos imunizados a reação era menor.

Sellards tentou ainda outras provas para verificação do poder antigênico das amebas. Por meio de teste microscópico, no qual sôro imune era pôsto em contato com amebas suspensas em água, observou lise de grande número de amebas com sôro imune. O sôro normal testemunho, pelo contrário, era até adequado para o desenvolvimento das ame-

bas. Por meio dessa mesma prova foram estudadas as relações biológicas existentes entre as quatro amebas já referidas (duas de vida livre e duas de origem intestinal). Verificou assim que dêsse ponto de vista elas eram diferentes, pois o poder lítico do sôro era específico para os respectivos organismos empregados na imunização. Como já foi assinalado as quatro amebas eram morfològicamente distintas embora pertencessem tôdas ao tipo *limax*.

Sellards para completar seu trabalho procurou evidenciar a presença de anticorpos em pessoas com amebíase, colocando o sôro sanguíneo dos pacientes, em contato com as quatro referidas amebas. Como o resultado não indicasse diferenças entre sôro de indivíduos doentes e normais, repetiu a mesma prova, usando, porém, sangue e muco de fezes diarréicas ricas em amebas, condições que lhe ofereciam segurança maior quanto à natureza patogênica das amebas empregadas. Também, esta experiência falhou para demonstrar anticorpos em sôro humano, pois a alteração das amebas se fazia de forma idêntica com sôro de doentes ou de pessoas normais. Como sabemos a demonstração de anticorpos (fixadores do complemento) em sôro de amebícos só veio a ser feita por Izar, em 1914.

Após Sellards, vários autores já anteriormente citados fizeram em animais experimentações imunológicas com protozoários, mas a prova cutânea só foi novamente considerada por Heathman (1932) que a executou com antígeno de amebas de vida livre e ainda com antígeno de *E h*. O trabalho dessa autora é amplo e dêle destacamos os pontos que julgamos de maior interêsse. Heathman empregou em seu estudo diferentes amebas cultivadas *in vitro* como segue:

E h, cultivada em meio de Boeck-Drbohlav modificado, no qual o sôro de cavalo foi substituído pelo de boi.

Chaos diffluens, *Polychaos dubia* e *Mayorella bigemma*, em água destilada contendo infusão de feno.

Flabellula citata e *Flabellula myra*, em água do mar contendo alga (*Fucus*), esterilizada pelo calor. Estas duas espécies cresciam satisfatoriamente associadas com uma bactéria tipo *pseudomona*.

Mayorella conipes, cultivada em água estéril com grãos de trigo.

Ao fim de 24 horas de cultivo, as amebas eram lavadas três vêzes por centrifugação "lenta" em soluto fisiológico, após o que recebiam solução salina fenolada a 0,4% e eram suspensas em nova solução salina, para serem introduzidas por via peritoneal em coelhos.

A autora verificou capacidade antigênica de todos os organismos usados, a julgar pela produção de anticorpos específicos, fixadores do complemento e aglutininas. Foi-lhe ainda permitido comprovar por meio desses anticorpos que as duas cêpas de *E h* empregadas eram semelhantes bem como havia certa identidade do ponto de vista imunológico entre a *F. citata* e a *E h*.

Heathmann executou ainda I R em coelhos imunizados com as diferentes amebas já mencionadas. A prova era executada injetando-se intradèrmicamente 0,1 ml dos antígenos daquelas amebas, preparados de acôrdo com as indicações seguintes. Antígeno de amebas de vida livre: sedimento de culturas, lavado como já foi indicado para o caso das injeções imunizantes, recebia, depois de sêco, a solução de Coca; a extração se fazia em temperatura ambiente durante 24 horas e a filtração em Berkefeld. O antígeno da *E h* era feito como o anterior, sendo porém o material triturado em gral por uma hora antes da filtração. As bactérias associadas com as amebas eram cultivadas à parte e delas se extraíam, pelos processos acima, antígenos para controle; o testemunho era também realizado com solução de Coca e no caso da *E h* ainda com sôro de boi diluído a 1:8.

O resultado da prova intradèrmica era lido imediatamente, 18 e 24 horas após a inoculação, e, ainda, diàriamente, durante uma semana. Heathman observou que, somente depois de imunizados, os coelhos passaram a dar prova intradèrmica positiva, caracterizada por uma área avermelhada e endurecida medindo 9 x 11 mm mais ou menos que aparecia ao fim de 18 horas e persistia até 3 a 5 dias. Entre as verificações feitas pela autora convém ainda salientar as seguintes: os animais injetados com *E h* reagiram à inoculação intradèrmica de antígeno de *Flabellula citata* mas não ao de *Flabellula myra*, embora antígeno desta última determinasse reação cutânea no animal imunizado com *F. citata*. Coelhos prèviamente injetados com cultura de *F. citata* mostraram pequena reação ao antígeno de *E h*.

O resultado dessas provas cutâneas está de acôrdo com o das de fixação do complemento, havendo portanto indicação de que existe certa semelhança antigênica entre a *E h* e a *F. citata*.

Ainda no ano de 1932 é publicado um trabalho sôbre reações sorológicas da *E h* (Menendez, 1932), no qual a reação cutânea é objeto de estudo. O autor imunizou coelhos com os seguintes organismos.

E h, 6 cêpas, designadas pelas letras A, B, C, D, E e L, entre as quais a D e E foram isoladas de fezes humanas disentéricas e a amostra L, de pus de abscesso hepático;

Endamoeba barreti, parasita, obtida pela raspagem de intestino de tartaruga, *Chelydra serpentina*. Essa ameba é morfológicamente semelhante à *E h*;

Balantidium coli, isolado de fezes de porco e empregado apenas em parte das experiências.

Êsses protozoários foram todos cultivados em meio de Tanabe & Chiba (base sólida de ágar a 1%, asparagina a 0,1% e solução de Ringer à qual eram adicionados 5% de sôro de coelho ou de cavalo e amido de arroz estéril).

Menendez padronizou a contaminação bacteriana das culturas de tôdas as cêpas de *E h*, de sorte que as diferenças porventura observadas entre elas nas experiências a serem realizadas deveriam ser atribuídas às próprias amebas e não à flora associada. Os coelhos empregados eram injetados por via endovenosa com sedimento lavado de culturas dos protozoários já referidos. O esquema para imunização compreendia 5 injeções intervaladas de 8 dias, sendo a primeira feita com amebas mortas pelo calor a 60° C, por uma hora, e as demais com sedimento de cultura contendo amebas vivas. As bactérias associadas aos protozoários eram cultivadas à parte e introduzidas em coelho segundo a forma já indicada.

Reações de fixação do complemento realizadas com sôro de animais imunizados demonstraram o poder antigênico dos referidos protozoários bem como evidenciaram que as diferentes cêpas de *E h* eram imunológicamente semelhantes. Provas de precipitação e amebólise confirmaram não só a capacidade antigênica da *E barreti* e da *E h* como

também a semelhança imunológica das diversas amostras desta última.

A parte do trabalho de Menendez que mais nos interessa é a que versa sobre a prova cutânea praticada em coelhos imunizados com *E h* e *E. barreti*, de acordo com a técnica já apontada anteriormente. No curso de seu estudo Menendez empregou vários métodos para a obtenção de material antigênico, mas os antígenos usados para a execução das provas intradérmicas foram preparados segundo uma única técnica, que passamos a descrever.

Amebas com 48 horas de cultura, com bom desenvolvimento verificado microscópicamente, eram postas em tubos de centrifugação, suspensas em solução de Ringer aquecida a 37° C e centrifugadas a "baixa velocidade" por 1 ou 2 minutos. Após remoção do líquido sobrenadante, a operação precedente se repetia por 3 vezes, de sorte que a quase totalidade das bactérias era removida. Esse sedimento lavado era colocado em frasco esterilizado juntamente com 10 volumes de solução de Coca e pérolas de vidro, permanecendo na geladeira por 24 horas e sendo frequentemente agitado para obtenção de autólise. Preparavam-se os antígenos, testemunhos, com as bactérias associadas aos dois rizópodes (*E h* e *E. barreti*), cultivadas no mesmo meio de Tanabe & Chiba. Ao sedimento dessas culturas adicionavam-se 10 volumes da solução de Coca e a extração se fazia como no caso anterior.

Três meses após terem recebido a última dose imunizante, os animais eram submetidos à injeção intradérmica de 0,1 ml dos antígenos. Foram empregados 5 antígenos de diferentes cêpas de *E h*, 1 de *E. barreti* e 2 testemunhos (1 de bactérias e outro de solução de Coca). Dessa forma cada um dos 8 coelhos empregados nesta experiência era submetido a 8 provas intradérmicas como se poderá verificar no quadro que segue. Os animais sofriam depilação com 24 horas de antecedência, sendo usados só os que não apresentavam irritação da pele. Os resultados eram lidos ao fim de 24 horas quando as reações positivas se mostravam mais fortes. Antes das imunizações as provas intradérmicas foram negativas com qualquer dos antígenos.

REAÇÕES CUTÂNEAS EM COELHOS PRÉVIAMENTE IMUNIZADOS

COM CULTURAS DE E. HISTOLYTICA E DE E. BARRETI

(Seg. Menendez, 1932)

Coelho número	Préviamente imunizado com	ANTÍGENOS							
		E. HISTOLYTICA					E. b.	Bactéria	Solução de Coca
		A	B	C	D	E			
59	Normal	-	-	-	-	-	-		
26	Bactéria	-	-	-	-	-	-	3	+
8	E h B	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	2 +		+
11	E h C	4 +	4 +	4 +	4 +	4 +	2 +	2	+
13	E h D	3 +	3 +	3 +	3 +	4 +	+		+
15	E h E	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	-		-
16	E h E	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	+		+
4	E b	-	-	-	-	-	4 +	2	+

E. b. = *Endamoeba barreti*

Reação intracutânea após 24 horas: 4 +, forte edema e vermelhidão; 3 +, edema moderado e vermelhidão; 2 +, só vermelhidão; + leve vermelhidão; sem reação.

Devemos destacar no trabalho de Menendez a capacidade antigênica da *E h* e da *E. barretti*, a julgar pela presença no sôro de animais imunizados com êsses organismos de anticorpos específicos evidenciados pela fixação do complemento, precipitação, lise e pela I R. As diferentes cêpas de *E h*, imunologicamente, comportaram-se da mesma maneira, dando reações espécie-específicas.

Menendez acredita que as reações sorológicas poderão contribuir para o diagnóstico da amebíase bem como para a classificação de certos parasitas animais.

Consideraremos finalmente um amplo estudo sôbre amebíase de autoria de Bieling (1935), no qual a I R é novamente praticada em animais. Êsse investigador alemão verificou que cães e gatos experimentalmente infectados com a *E h* apresentavam resistência à reinfeção. Acreditando que tal fenômeno corresse paralelamente com a alergia a cutânea específica, investigou-a nesses animais. No preparo do antígeno Bieling empregou intestino grosso de gatos mortos por disenteria amebiana aguda. As partes da mucosa que apresentavam alterações patológicas eram raspadas e sêcas a 58° C. Após trituração em gral, o pó obtido era suspenso em sôro fisiológico e usado como antígeno. O contrôle, preparado com mucosa intestinal de gatos sadios.

As provas eram executadas pela injeção intradérmica de 0,2 - 0,3 ml dos antígenos. Em gatos sãos, doentes e curados de amebíase, não foram vistas diferenças de reações. Em cães, as injeções do antígeno de prova determinaram reação nos animais sadios e nos amélicos, nestes, porém, mais intensa e duradoura. O extrato de contrôle, por vêzes, provocou reação. As reações se positivaram ao fim de horas, podendo perdurar de 1 a 2 dias.

Êsses experimentos preliminares indicaram a Bieling a necessidade de obter antígenos amebianos mais puros, o que foi tentado por meio de fermentação separativa, de acôrdo com a seguinte técnica: muco intestinal de gatos, rico em amebas, era aquecido rapidamente e semeado em meio de cultura líquido juntamente com o *Bacillus mycoides*. Após 5 semanas de incubação, obtinha-se filtrado isento de proteínas, com reação do biureto negativa, devida à influência dos fermentos do *B. mycoides*. O filtrado recebia,

após centrifugação, solução de formalina a 2%. O líquido obtido, amarelado, foi usado em diluições a 1:5, 1:10 e 1:20, em provas intradérmicas, em 3 cães. O testemunho para esse antígeno era preparado com material idêntico, com tendo lisado de bacilos típicos.

Dentre os cães injetados, 2 haviam sido curados de amebíase, não apresentando a *E h* nas fezes, respectivamente há 15 dias, e há 2 meses. O outro animal estava doente, eliminando ameba há mais de 4 meses. Em todos esses 3 animais, o extrato específico produziu reação em 10 a 15 minutos, com edema e vermelhidão periférica, que perdurava por cerca de 24 horas. O extrato de controle não provocou alteração.

Bieling experimentou um terceiro tipo de antígeno, preparado com material de abscesso amebiano de gato, sem contaminação bacteriana secundária. O conteúdo do abscesso era seco a 37° C e triturado em gral. A 0,6 g do pó obtido, adicionavam-se 6 ml de solução fisiológica e 3 gotas de clorofórmio, sendo a mistura agitada, com pérolas de vidro, durante 8 horas. Após centrifugação obtinha-se líquido claro, então empregado para as provas intradérmicas, no volume de 0,2 - 0,3 ml. Gatos sadios e infectados recentemente (há 5 dias no máximo) não apresentaram reações diferentes. Foram ainda injetados com este antígeno 5 cães, sendo 2 sãos, como controle, e 3 que haviam tido infecções amebianas intestinais durante 5, 8 e 18 meses, e sem *E h* nas fezes há, respectivamente, 18, 24 e 8 meses. Todos estes 3 animais apresentaram I R positiva ao fim de 10 minutos com o antígeno específico, concentrado ou diluído a 1:5. Ao fim de horas o edema diminuía e a reação quase se negativava em 24 horas. A ausência de reação nos 2 cães testemunhos demonstrou a especificidade da prova.

Bieling concluiu pela existência de alergia cutânea específica, em cães, ao antígeno amebiano purificado. Acredita que a falha da prova em gatos possa ser atribuída à evolução rápida da moléstia nesses animais, o que não permitiria desenvolvimento de estado alérgico, contrariamente ao que ocorre em cães, nos quais a amebíase assume caráter crônico. Sugere finalmente que se façam experiências no homem, para esclarecer se a I R pode ser empregada

da para fins diagnósticos, lembrando a possibilidade de que pessoas já curadas de longas infecções amebianas apresentem provas positivas, a exemplo do que foi observado em cães.

O trabalho de Bieling é longo e compreende o estudo de outros problemas de menor interêsse para nós.

* *
* *
* *

A revisão da literatura que vimos de fazer mostra que, após o trabalho inicial de Scalas (1923), no qual há boa indicação de que a I R possa contribuir para o diagnóstico da amebíase no homem, unicamente dois outros pesquisadores, Spector (1932) e Secret (1952), no espaço de 3 décadas, seguiram as pegadas daquele autor italiano e aplicaram novamente a prova intradérmica, sem contudo confirmar os seus resultados. Outros poucos autores executaram a referida prova em animais infectados ou parenteralmente injetados com a *E h*, bem como com outras amebas, obtendo de maneira geral resultados favoráveis, pois os animais usados passaram a reagir à injeção intradérmica dos respectivos antígenos.

Não existe, porém, até o momento qualquer evidência sobre o real valor da I R como meio de diagnóstico da infecção amebiana no homem. O problema é naturalmente complexo e está a exigir repetidos estudos. Só assim serão acumulados conhecimentos que permitirão, no futuro, fixar-se de forma definitiva o verdadeiro valor da prova intradérmica no diagnóstico da amebíase.

Nosso trabalho experimental, apresentado no capítulo seguinte, não pretende, de forma alguma, solucionar em definitivo o problema, mas representa um esforço cujo objetivo maior é contribuir para a ampliação dos conhecimentos existentes acerca da I R na amebíase. Tentaremos investigar a reação cutânea à injeção intradérmica de antígeno amebiano, relacionar seu resultado ao da pesquisa da *E h* nas fezes e fixar, se possível, o valor da I R como meio diagnóstico da infecção amebiana no homem.

CAPÍTULO II

MATERIAL E MÉTODO

DE ESTUDO

1 - ANTÍGENOS

A) - CONSIDERAÇÕES GERAIS

No que concerne ao antígeno, elemento de primordial importância para o estudo a que nos propusemos, devemos ressaltar que, desde o início, consideramos as dificuldades de sua obtenção, em condições satisfatórias. Se, para a prova de fixação do complemento na amebíase, ainda não se estandardizou um antígeno adequado, apesar de ser ponto pacífico, desde há muito, que, nessa protozoose, se produzem os respectivos anticorpos fixadores, mais difícil se nos apresentava o problema, de vez que ainda não está devidamente comprovado que a infecção amebiana determine uma alergia cutânea específica, fato, aliás, que motivou em parte a presente investigação.

Já que nossa finalidade era pesquisar a reatividade cutânea à *E h* ou aos seus produtos, impunha-se, de pronto, eleger a fonte de material antigênico. Nossa escolha recaiu naturalmente na cultura desse rizópode que, como é sabido, pode ser feita rotineiramente *in vitro*. Apresenta, entretanto, certas dificuldades, o que nos levou a considerar a hipótese de que organismos de mais fácil cultivo, como amebas de vida livre, pudessem substituir a *E h* e constituir-se em fonte de material adequado para o preparo de antígeno. Essa idéia nos ocorreu de imediato por dispormos no laboratório de uma ameba de vi-

da livre, a *Endamoeba moshkovskii* (Tshalaia, 1941) - que doravante designaremos por *E m* - por nós isolada de material de esgoto (Amaral & Azzi Leal, 1949), que desde muitos anos vimos mantendo em cultura com particular facilidade, mesmo à temperatura ambiente. A semelhança morfológica desse organismo com seu congênico a *E h* é marcada (v. figura nº 1, pg. 43), sendo necessárias provas biológicas para que se possa diferenciá-los. Tal fato constituía boa razão para que puséssemos em prática nossa idéia, dado que muitas vezes à semelhança estrutural corresponde semelhança antigênica.

No capítulo anterior foram considerados trabalhos que evidenciaram, *in vitro*, por meio de provas de fixação de complemento e outras, bem como *in vivo* pela I R, que ambas parasitas ou não, em geral, são dotadas de capacidade antigênica. Tais provas possibilitaram, ainda, o conhecimento das relações do ponto de vista antigênico entre diferentes protozoários de vida livre ou não. Com referência a esse assunto será oportuno fazer nova alusão, ainda que breve, ao trabalho de Heathman (1932). Essa autora, recordemos, investigou a ação em coelhos das seguintes amebas injetadas por via parenteral: *E h*, *Chaos diffluens*, *Polychaos dubia*, *Mayorella bigemma*, *Flabellula citata*, *Flabellula myra* e *Mayorella conipes*. Todas elas mostraram capacidade antigênica, a julgar pelo resultado de diferentes provas imunológicas (fixação de complemento, precipitação e I R). Animais injetados com *E h* reagiram à inoculação intradérmica de antígeno de *F. citata* mas não ao de *F. myra*, embora antígeno desta determinasse reação cutânea nos coelhos imunizados com *F. citata*. Animais injetados com *F. citata* mostraram pequena reação com extrato de *E h*. Os resultados desses testes cutâneos concordaram com os de fixação do complemento, indicando a existência de reações cruzadas entre a *F. citata* e a *F. myra* e entre a *E. h* e a *F. citata*. Não havia, porém, semelhança imunológica entre a ameba patogênica e a *F. myra*.

A observação ora relatada constituiu apóio para nosso desejo de praticar a I R no homem com antígeno de ameba de vida livre, a *E m*. Com efeito, se Heathman verificou comportamento antigênico semelhante entre a *E h* e a *F. citata*, pelo menos teoricamente nós dispúnhamos de igual ou maior probabilidade de verificar situação semelhan

te entre a *E h* e a *E m*, em vista de serem elas morfológicamente indistinguíveis. Como já dissemos, à identidade estrutural corresponde muitas vezes constituição antigênica semelhante. Essa é apenas uma boa hipótese que pode não confirmar-se na prática. Lembre-se a propósito o também já citado trabalho de Menendez (1932), que, experimentalmente, em coelhos, observou escassa semelhança antigênica entre a *E h* e a *Endamoeba barreti* por meio de várias provas (fixação de complemento, precipitação, amebólise e I R); entretanto, como se sabe, a *E h* e a *E. barreti* são morfológicamente semelhantes.

De qualquer forma, porém, forçoso é reconhecer que nosso propósito de ensaiar o preparo e aplicação de antígeno de *E m* apresentava, desde logo, um objetivo, qual seja, o de verificar as eventuais relações antigênicas daquela ameba com a *E h*, objetivo justificado por dados científicos, como o observado por Heathman (1932) relativamente à semelhança imunológica de amebídeos diversos. É claro que a procura das referidas relações poderia ser feita por meio de diferentes provas imunológicas, nas quais se incluía a própria I R. A adoção desta prática se impunha, obviamente, em vista das finalidades do nosso trabalho. Ao que parece, a execução da I R com extrato de amebas de vida livre nunca foi tentada no homem. A ela fomos levados, não pelo aspecto de originalidade, mas, sobretudo, pelo interesse da questão, ao qual nos referiremos daqui a um instante. Por ora, não nos parece demais insistir que o elemento base de presunção de possíveis relações antigênicas entre a *E m* e a *E h* é a semelhança morfológica.

Não cuidamos, evidentemente, que a *E m* pudesse parasitar o homem e que, como consequência, determinasse a elaboração de anticorpos específicos reveláveis pela prova cutânea ou outra qualquer. Mesmo que essa ameba ubiqüitária, como o é, e bastante resistente, fôsse ingerida pelo homem, a exemplo do que pode ocorrer com outros organismos ditos coprozóicos, não haveria entre a *E m* e os tecidos do hospedeiro o contato íntimo e prolongado indispensável para o estímulo à elaboração de anticorpos. Aliás, já tentamos implantar a *E m* em intestino de animal, injetando cultura dessa ameba, por via intracecal, em cobaias. Nossa experimentação mostrou que a sobrevida da *E m*, no conteúdo cecal da cobaia, limitava-se a 48 horas apenas, e, como é

ra de se esperar, a mucosa nunca foi invadida, nem mesmo no local ferido pela injeção inoculadora (Azzi Leal & Amaral, 1950).

Isto pôsto, digamos que, se o estudo das relações imunológicas da *E m* e da *E h* concluísse por uma semelhança antigênica entre as duas amebas, isto é, se ficasse positivada a possibilidade do extrato antigênico de *E m* se unir ao anticorpo da *E h*, seríamos levados à interessante perspectiva de poder substituir esta por aquela no preparo de antígenos aplicáveis não só à prova cutânea como a outras, v.g., a de fixação do complemento; a decorrência prática de um tal proceder se compreende, sem esforço, ao atentar-se para a já referida facilidade com que se cultiva a *E m*.

Pois bem, tendo presente os diversos fatos que acabam de ser assinalados, foi que demos início às nossas investigações com material de cultura de *E m*, para posteriormente fazer as diversas provas com antígenos de *E h*.

O preparo de antígeno dessas duas amebas foi realizado a partir de culturas por nós isoladas e mantidas *in vitro* de acôrdo com as indicações que se seguem.

B) - CULTURAS DE *ENDAMOEBIA HISTOLYTICA*

É sabido que as culturas de amebas podem ser feitas a partir de fezes contendo trofozoítos ou cistos. As nossas foram feitas a partir destes últimos. A semeadura dos cistos, segundo Amaral (1944), deve ser feita de diferentes modos, de acôrdo com os fins que se têm em mira. Se a finalidade única é a de diagnóstico, inoculam-se as fezes puras nos meios de cultura. Para a obtenção de material de antígeno, entretanto, é de toda a conveniência a semeadura de cistos bem lavados, de modo a diminuir ou impedir o crescimento de outros micro-organismos encontrados nas fezes, os quais iriam tornar precário ou entravar o desenvolvimento das amebas. Com efeito, a inoculação de fezes puras, sem qualquer tratamento prévio, nos meios de cultura, nunca dá resultados constantes e satisfatórios, pois o material fica altamente contaminado pelo crescimento de bactérias intestinais e de *Blastocystis hominis*.

Diante disto, submetíamos o material a ser cultivado ao seguinte tratamento: uma parte de fezes contendo cistos de *E h* era misturada com 10 partes de água destilada, sendo depois essa suspensão coada em gaze dobrada em quatro ou em tamis metálico com 80-100 malhas com cm^2 , recebido o material em cálice de sedimentação.

Ao fim de três horas, transferiram-se por meio de pipeta cerca de 2 ml de sedimento para tubo de ensaio 100x13 mm. O material era lavado em água destilada por centrifugação, a 2.000 r.p.m., até que o sobrenadante se apresentasse limpo (duas a quatro operações de 5 minutos cada). Enchia-se o tubo contendo o sedimento final lavado com solução de ácido clorídrico normal, e, após agitação manual, centrifugava-se uma vez, nas mesmas condições anteriores. Finalmente, o sedimento, após ser lavado por centrifugação, três vezes em água destilada, para retirada do ácido clorídrico, estava pronto para ser semeado.

O meio de cultura empregado foi o de Amaral (1945), meio este que, desde muitos anos, vem-se mostrando inteiramente satisfatório para tal propósito e que apresenta, entre outras, a vantagem de ser líquido, o que facilita as manipulações para preparo do antígeno. Cada tubo de 120 x 15 mm, contendo 5 ml do meio de Amaral, recebia uma pitada de amido de arroz em pó, esterilizado. O material contendo cistos, previamente tratado como já foi descrito, era adicionado ao meio de cultura e incubado a 37° C. Os transplantes (1 ml) eram feitos com pipeta cada 48 horas, e, geralmente, ao fim de 4-5 repiques, as amebas se adaptavam ao meio e mostravam bom crescimento. Fazia-se, então, novo controle diagnóstico, pelo exame de preparados corados pela hematoxilina férrica. Algumas mostras foram desprezadas devido ao crescimento de *Blastocystis hominis* ou de amebas tipo *Hartmannella*, concomitantemente com a *E h*.

Foram assim isoladas e selecionadas para o presente estudo quatro cêpas de *E h*: 11.302, IPC, HCO e JS.

Será oportuno referir que certos autores admitem que diferentes cêpas de *E h* se comportam imunologicamente de forma semelhante, de sorte que qualquer cultura daquele rizópode seria fonte de material para o preparo de antígeno satisfatório. Citamos, a esse propósito, ainda u

ma vez Menendez (1932), que verificou a semelhança antigênica de 6 diferentes amostras de *E h*. Outros investigadores, pelo contrário, acreditam na necessidade do emprego de antígenos polivalentes, baseados principalmente em resultados de provas de fixação do complemento (Bozicevich, 1951).

De qualquer maneira, seria mais recomendável que, para a feitura de nossos antígenos, empregássemos várias cepas para contar com maiores probabilidades de êxito, caso exista, realmente, variação de antigenicidade em diferentes amostras de *E h*.

No nosso caso, utilizamo-nos das 4 cepas acima referidas. Duas delas (11.302 e HCO), oriundas de pacientes com sintomatologia que se poderia atribuir à amebíase, eram constituídas por amebas grandes, cujos cistos mediam mais que 10 micra de diâmetro. Consignamos êste pormenor porque certos autores, e Brumpt entre êles, acreditam que o poder invasivo da *E h* tem relação com seu tamanho; as raças grandes teriam poder patogênico acentuados. As outras duas cepas (JS e IPC) eram originárias de portadores aparentemente sãos e seus cistos tinham cerca de 8 micra de diâmetro.

Acreditamos que as amostras de *E h*, por nós selecionadas, embora em pequeno número, representando diferentes tipos morfológicos e quiçá antigênicos, constituíam material adequado para preparo de antígeno.

Logo que as amebas se mostravam adaptadas à cultura, faziam-se repiques, de maneira que, de cada tubo, fôsse obtidos 2 ou 3 novos. Assim, em alguns dias, dispúnhamos de dezenas de tubos de cultura que, após incubação, forneciam o material empregado no preparo de antígeno. Embora haja uma certa variação no crescimento e reprodução da *E h in vitro*, as cepas isoladas se desenvolviam, de maneira geral, satisfatoriamente, como se verificava ou pelo exame direto dos tubos ao microscópio, ou pelo de uma gota de material em lâmina. Em algumas contagens por nós executadas encontramos cerca de 250.000 amebas por ml do meio de cultura com 48 horas de crescimento.

Ao terminar estas considerações sôbre as culturas de *E h* que serviram de fonte para o nosso antígeno amebiano, devemos assinalar que, em provas preliminares, tentamos

obter um antígeno mais puro, a partir de cistos daquela ameba, os quais podem ser completamente desembaraçados das bactérias que a acompanham na cultura. Para isso, procuramos cultivar cêpas de *E h* de acôrdo com as recomendações de Stone (1935). Entretanto, em vista da precariedade com que conseguimos o encistamento, as tentativas para obter antígeno a partir de cistos foram abandonadas.

C) - CULTURAS DE *ENDAMOEBIA MOSHKOVSKII*

As culturas de *E m* empregadas foram as mesmas que há muito mantemos no laboratório, isoladas de material de esgôto (Amaral & Azzi Leal, 1949). O meio de cultura adotado é o de Amaral (1945), e a temperatura, ambiente, condições que permitem, a êste rizópode de vida livre, desenvolvimento exuberante. Os repiques podiam ser feitos a grandes intervalos, cada 20, 30 ou mais dias, mas, como norma, neste estudo, fizemo-los uma vez por semana. No laboratório, contamos com duas cêpas de *E m*, uma oriunda de efluente de esgôto clorado e outra de lôdo digerido. Não encontramos qualquer elemento de natureza morfológica que permitisse distinguir essas duas amostras.

O preparo de dezenas de tubos de cultura de *E m* se fazia facilmente. O crescimento dessa ameba é mais regular do que o da *E h*.

O cultivo de *E m* e de *E h* diferia, portanto, no intervalo entre os repiques e na temperatura.

D) - TÉCNICA PARA O PREPARO DOS ANTÍGENOS DE PROVA

Dezenas de tubos de cultura de *E h* ou de *E m* eram empregados no preparo dos respectivos antígenos. Dentre as várias técnicas possíveis, adotamos a que será descrita a seguir e que foi a mesma para ambas as amebas. Após incubação adequada, tubos em igual número, das diferentes cêpas, eram submetidos a leve agitação manual para suspender o material sedimentado, mais rico em amebas. O conteúdo era então transferido para tubos com capacidade de 50 ml, que eram levados ao centrifugador por 10 minutos, a 2.000 r.p.m. Após remoção do sobrenadante por meio de pipeta, o sedimento era lavado duas vezes em sôro fisiológico, nas mesmas condições anteriores, isto é, por 10 minu-

tos a 2.000 r.p.m. O sedimento final recebia pérolas de vidro e solução de mertiolato a 1: 10.000 em sôro fisiológico, na proporção de 1 ml para cada 6 tubos de cultura; o motivo da escolha desta proporção será explicado mais adiante. O tubo fechado com rolha de borracha foi, nas primeiras tentativas, submetido à agitação manual, diariamente, por cêrca de 5 minutos. Verificamos, entretanto, pelo exame microscópico, que tal método era inadequado, pois, após 6 dias, restavam ainda íntegros muitos corpos amebianos de *E m.* Passamos, então, a empregar a agitação em aparelho elétrico, de Boerner & Mudd, conseguindo, para as duas espécies de endameba, desintegração completa, o que viria assegurar melhor extração de antígeno. A agitação era feita diariamente durante 30 minutos até totalizar duas horas. Fora dêsse período, o material permanecia em estufa a 37° C, da qual era retirado ao fim do 8º dia, sendo então centrifugado por 10 minutos a 2.000 r.p.m., e finalmente filtrado. Se a quantidade a filtrar era grande (8-10 ml), empregava-se o filtro Seitz esterilizante montado em frasco de Kitasato ligado a uma trompa de água durante cêrca de meia hora. Quando a quantidade era menor fazia-se a filtração em micro filtro de Seitz (tipo Swinny), adaptado a uma seringa de vidro de 10 ml. Com isto, obtivemos o que designamos por antígeno A.

Preparavamos outro tipo de antígeno que diferia do primeiro pelo fato de que o sedimento final das culturas, lavado, era sêco no vácuo à temperatura ambiente. O pó era tratado da mesma maneira que o sedimento das culturas utilizado no preparo do antígeno anterior, isto é, a adição de mertiolato, a agitação da mistura, a permanência para extração na estufa e a filtração se faziam como para o antígeno A.

Por qualquer dos dois processos anteriores, o antígeno obtido era límpido e incolor, comparável, no aspecto, à água destilada. O antígeno era conservado à temperatura de 3-5°C, em frascos-ampola esterilizados.

Os primeiros antígenos obtidos foram os de *E m.*, com os quais demos início a uma série de experiências preliminares, indispensáveis ao encaminhamento da investigação. Verificamos, por intermédio delas, que o antígeno em que

o sedimento era sêco no vácuo, quando injetado intradérmicamente em vários voluntários, não produzia, via de regra, qualquer reação; o contrário acontecia com o antígeno *A*. Em vista de tal verificação, nosso estudo prosseguiu utilizando, unicamente, êste último antígeno e todas os nossos resultados a êle se referem.

Passaremos, agora, a encarar a questão há pouco aludida, qual seja a da determinação do volume de líquido extrativo a ser empregado, questão básica, pois a intensidade das reações cutâneas, em um mesmo indivíduo, depende da capacidade antigênica do material inoculado; esta, por seu turno deve guardar relação com a concentração do substrato em termos do número de corpos amebianos em um dado volume, desde que se admita que é nêles e não fora dêles que se encontra a substância ativa.

Se a contagem das amebas era factível, utilizando, por exemplo, métodos e instrumental semelhantes aos usados na hemocitometria, podia-se, em uma primeira aproximação menos rigorosa mas de alcance prático imediato, admitir que, sendo empregadas culturas mais ou menos uniformes, fôsse o número de amebas, dentro de limites razoáveis de variação, proporcional ao número de tubos de cultura empregados. Aceitamos êste último princípio, e, na caracterização do critério de uniformidade, procedemos da forma seguinte.

De cada partida, separávamos os tubos de cultura que mostravam bom desenvolvimento, julgado pelo exame microscópico direto do tubo, ou de uma gota de cultura em lâmina; nesta última eventualidade considerava-se satisfatória a presença, em média, de 10 amebas por campo (ocular 5, obj. 10). Esta seleção era feita somente para os tubos de cultura da *E h*, pois, para a *E m* o crescimento se fazia com mais regularidade, como vínhamos observando desde há anos, obtendo-se cêrca de 15 amebas por campo nas condições indicadas.

Pois bem, ensaios preliminares consistentes em injetar intradérmicamente antígenos com concentrações variáveis em voluntários que se prestaram a tais provas, mostraram que, em geral, o emprêgo da proporção de 1 ml de mertiolato para o sedimento de cada 6 tubos de cultura de *E m* ou de *E h* conduzia, em geral, a extratos amebianos sa

tisfatórios, quando julgados em termos da intensidade da reação positiva, porventura por êles provocada.

Como últimos pormenores, salientamos:

- a) - qualquer antígeno só era empregado após comprovação de sua esterilidade para germes aero e anaeróbios; neste particular, a filtração adotada sempre demonstrou ser eficiente;
- b) - o pH dos extratos variava de 6,9 a 7,3, próximos aliás do pH do meio de cultura usado (7,2); tais determinações foram feitas com o grau de precisão suficiente, por meio do papel indicador universal de Merck;
- c) - utilizando sempre as mesmas câpas e idênticas manipulações técnicas, preparamos 7 partidas de antígeno de *E m* e 8 de *E h*, as quais são numeradas por algarismos romanos; a despeito destas precauções, veremos que os antígenos correspondentes às diversas partidas, quer da *E m* quer da *E h*, não apresentaram sempre reações concordantes, o que sugere, desde logo, que, como era até certo ponto previsível, a capacidade antigênica não deve ser função unicamente do número de corpos amebianos, devendo estar envolvidos fatores outros ainda desconhecidos; o estudo de tal problema poderá eventualmente fornecer melhores conhecimentos sobre o assunto, permitindo a obtenção de antígenos com atividade mais rigidamente padronizada;
- d) - não nos foi possível, nas condições em que realizamos este trabalho, fixar o período de conservação da potência do antígeno; podemos apenas mencionar que, durante o prazo de utilização de cada uma das nossas partidas, prazo este que se estendeu, variavelmente de 1 a 2 meses, não ocorreram diferenças preceptíveis de comportamento em cada uma delas.

E) - ANTÍGENO TESTEMUNHO

No início de nossos trabalhos, usamos, para controle das I R, o próprio veículo empregado para a extração do

antígeno, isto é, a solução de mertiolato a 1:10.000 em sôro fisiológico. Posteriormente, passamos a usar um testemunho mais adequado a uma experimentação do tipo da que estavamos levando a efeito, qual seja o extrato das bactérias que acompanham as amebas nas culturas.

Embora, como já referimos, nossos experimentos tenham sido iniciados com antígeno de *E m*, o testemunho bacteriano primeiro empregado foi obtido a partir dos germes associados à *E h*. Este proceder, que poderia parecer paradoxal, encontra sua justificativa numa questão de facilidade técnica, consistente em que a simples permanência dos tubos de cultura de *E h* em temperatura ambiente assegurava, na maioria dêles, a obtenção de material em que somente conservavam vitalidade os germes associados, o que era facilmente comprovado por seu transplante para o próprio meio de Amaral. O fato acima apontado não ocorria no caso da *E m* pela razão evidente de desenvolver-se este rizópode em temperatura ambiente. Neste caso, o recurso empregado foi o de isolar os germes aereos e anaeróbios pelas técnicas bacteriológicas habituais, processo, aliás, estendido ao isolamento da flora associada à *E h*.

Isolados os germes, eram êles misturados, desde que provenientes de uma mesma cêpa, e cada uma das 6 misturas assim obtidas - correspondentes a quatro amostras de *E h* e as duas de *E m* - cultivadas no próprio meio de Amaral.

Repiques sucessivos garantiam o fornecimento de material necessário ao preparo dos testemunhos, seguindo técnica em tudo análoga à empregada na preparação dos antígenos de prova; visava-se, com isso, que o testemunho bacteriano e o antígeno de prova diferissem, tão somente, pela ausência naquele de extrato amebiano.

Queremos, finalizando esta parte, deixar consignado que os trabalhos de bacteriologia revelaram o seguinte:

CULTURAS OBTIDAS DOS GERMES ASSOCIADOS À *E. HISTOLYTICA*
CÊPA IPC;

DIPLOCOCOS GRAM-NEGATIVOS.

COCOS GRAM-POSITIVOS (ESTAFILOCOCO?).

COCO-BACILOS GRAM-NEGATIVOS E FORMAS FILAMENTOSAS.

BACILOS GRAM-NEGATIVOS.
DIPLOCOCOS GRAM-NEGATIVOS, GRANDES.
BACILOS GRAM-NEGATIVOS, MAIS OU MENOS FINOS.
COCOS GRAM-POSITIVOS, EM CACHOS (ESTAFILOCOCO?).
BACILO ANAERÓBIO, ESPORO TERMINAL, OVAL.
BACILO AERÓBIO, GRAM-NEGATIVO.

CÊPA 11.302 :

BACILOS GRAM-NEGATIVOS, FORMAS FILAMENTOSAS.
BACILOS GRAM-NEGATIVOS, CURTOS E FORMAS FILAMENTOSAS.
BACILOS GRAM-NEGATIVOS, PEQUENOS.
BACILOS GRAM-NEGATIVOS, GRANDES E PEQUENOS.
BACILOS GRAM-NEGATIVOS, CURTOS E FORMAS FILAMENTOSAS.
BACILOS GRAM-NEGATIVOS, PEQUENOS.
COCO-BACILOS GRAM-NEGATIVOS.
BACILOS GRAM-NEGATIVOS, MAIS OU MENOS FINOS.
COCOS GRAM-POSITIVOS, EM GRUPOS REGULARES (*Sarcina?*).
BACILO ANAERÓBIO, ESPORO TERMINAL, OVAL.

CÊPA JS:

COCO-BACILOS GRAM-NEGATIVOS.
BACILOS PEQUENOS GRAM-POSITIVOS (DIFTERÓIDE?)
COCOS GRAM-POSITIVOS, EM FORMA TETRAGÊNICA.
COCOS GRAM-POSITIVOS, EM CACHOS (ESTAFILOCOCO?).
DIPLOCOCOS GRAM-NEGATIVOS.
COCOS GRAM-POSITIVOS, CROMOGÊNICOS (*Sarcina aurantiaca?*).
BACILOS PEQUENOS GRAM-POSITIVOS (DIFTERÓIDE?).
BACILOS ANAERÓBIOS, ESPORULADOS, GRAM-POSITIVOS, COAGULANDO
O LEITE COM FRAGMENTAÇÃO DO COÁGULO PELA ABUNDANTE FOR
MAÇÃO DE GÁS (*Cl. perfringens*).

CÊPA HCO;

BACILOS PEQUENOS GRAM-POSITIVOS.
BACILOS PEQUENOS, GRAM-NEGATIVOS.
BACILOS LONGOS, FILAMENTOSOS, GRAM-POSITIVOS.
BACILOS LONGOS, FILAMENTOSOS, GRAM-NEGATIVOS.
COCOS GRAM-POSITIVOS, EM CACHOS
BACILOS GRAM-NEGATIVOS, FINOS, DELICADOS E CURVOS.
BACILOS GRAM-NEGATIVOS, FINOS E LONGOS.

BACILOS ANAERÓBIOS, ESPORULADOS, GRAM-POSITIVOS, COAGULANDO O LEITE COM FRAGMENTAÇÃO DO COÁGULO PELA ABUNDANTE FORMAÇÃO DE GÁS (*Cl. perfringens?*).

CULTURAS OBTIDAS DOS GERMES ASSOCIADOS À *E. MOSHKOVSKII*

CÉPA LÔDO DIGERIDO DE ESGÔTO:

BACILOS GRAM-POSITIVOS, AERÓBIOS.
BACILOS PEQUENOS, GRAM-POSITIVOS, PROVÁVELMENTE DIFTERÓIDE.
BACILOS ANAERÓBIOS, ESPORULADOS, GRAM-POSITIVOS, COAGULANDO O LEITE COM FRAGMENTAÇÃO DO COÁGULO PELA ABUNDANTE FORMAÇÃO DE GÁS (*Cl. perfringens*).

CÉPA ESGÔTO CLORADO:

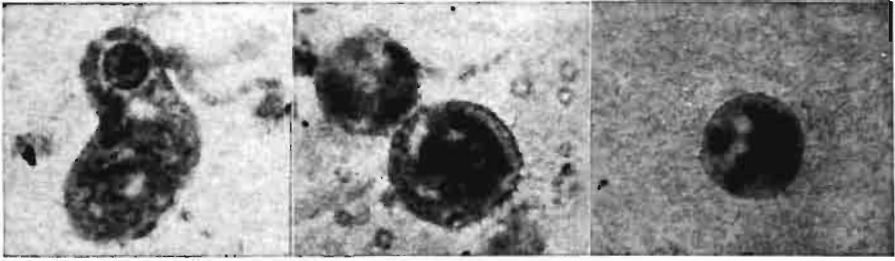
BACILOS GRAM-NEGATIVOS, CROMOGÊNICOS, COM PIGMENTO AMARELO.
BACILOS GRAM-NEGATIVOS.
COCOS GRAM-POSITIVOS, CROMOGÊNICOS, COM PIGMETO AMARELO.
BACILOS GRAM-NEGATIVOS, ALGUNS CURTOS, OUTROS LONGOS E FORMAS FILAMENTOSAS.
BACILOS GRAM-POSITIVOS, PEQUENOS (DIFTERÓIDE?).
BACILOS ANAERÓBIOS, ESPORULADOS, GRAM-POSITIVOS, COAGULANDO O LEITE COM FRAGMENTAÇÃO DO COÁGULO PELA ABUNDANTE FORMAÇÃO DE GÁS (*Cl. perfringens?*).

2 - TÉCNICA DAS INTRADERMO-REAÇÕES E LEITURA DE SEUS RESULTADOS

As injeções eram feitas por via intradérmica na dose de 0,1 ml com seringa de 1 ml graduada em centésimos ou décimos e agulhas de 10 x 5/10 mm. O local eleito foi a face anterior do antebraço, fazendo-se, por vèzes, no mesmo antebraço, duas ou mais provas simultâneas, de acôrdo com o número de antígenos empregados, mantendo-se, porém, a maior distância possível entre as injeções, para evitar dificuldades na leitura dos resultados, decorrentes da confluência de reações, se positivas; as inoculações do ou dos testemunhos eram feitas no mesmo antebraço ou no outro, de acôrdo com as condições de cada caso.

Na parte referente à leitura da I R tivemos de nos defrontar com os dois problemas clássicos atinentes a questões análogas, quais sejam, o do momento da realização da leitura e o do encontro de um critério classificado e dos resultados observados. Embora dispuséssemos de conhecimentos estabelecidos em casos análogos de alergia infecciosa, é natural que nossa conduta se baseasse em dados colhidos através de experiências com o próprio antígeno em estudo. Pois bem, no que diz respeito ao momento da leitura, nossas observações mostraram que, em reduzido número de casos, aparecia dentro de 20 minutos no máximo, contados a partir do instante da feitura da prova, uma reação do tipo imediato, consistente numa zona eritematosa em torno do botão dérmico do qual emergiam prolongamentos em pseudópodes; tal reação, em geral, desaparecia rapidamente e era ou não acompanhada de reação tardia. Cedo, porém, convencemo-nos de que, a exemplo, do que acontece na grande maioria das provas cutâneas de alergia infecciosa, é à reação tardia que devemos atribuir significado. Esta, que se iniciava cêrca de 3 horas após a injeção, consistia em uma área eritematosa localizada em tórno do ponto injetado, com dimensões variáveis - a distância dos 2 pontos mais afastados atingindo em casos extremos 9 a 10 cm e acompanhada, por vêzes, de edema (v. figura nº 2, pg.43) Estes fenômenos atingiam o máximo de intensidade ao fim de 20 a 24 horas. A reação desaparecia ao cabo de cêrca de 24 a 48 horas, contadas a partir do seu acme, deixando nos indivíduos de pele clara, por poucos dias, pequena mancha pardacenta.

Quanto à catalogação dos resultados das I R, o melhor critério, devido à sua objetividade e facilidade, é o da extensão da zona eritematosa, medida pela distância entre os dois pontos mais afastados. Se se pretendesse, como é habitual, enquadrar em certo número de grupos as diversas medidas obtidas, ter-se-ia naturalmente de estabelecer normas para a distinção dêstes grupos. No nosso caso esta tarefa se simplificava, pois a dicotomização dos resultados em positivos (+) e negativos (-) foi a única subdivisão julgada condizente com a natureza e finalidade da pesquisa, verdadeira exploração do terreno. Com isto, restava, antes de tudo, estabelecer o limite inferior da zona eritematosa acima do qual a reação seria con



a

b

c

Fig. 1 — Microfotografias de *E. moshkovskii*, em cultura. Coloração pela hematoxilina férrica.

a e b: Trofozoítos com um núcleo (x1400) e com dois núcleos (x1200)

c: Cisto com dois núcleos visíveis e corpos cromatóides (x1200).

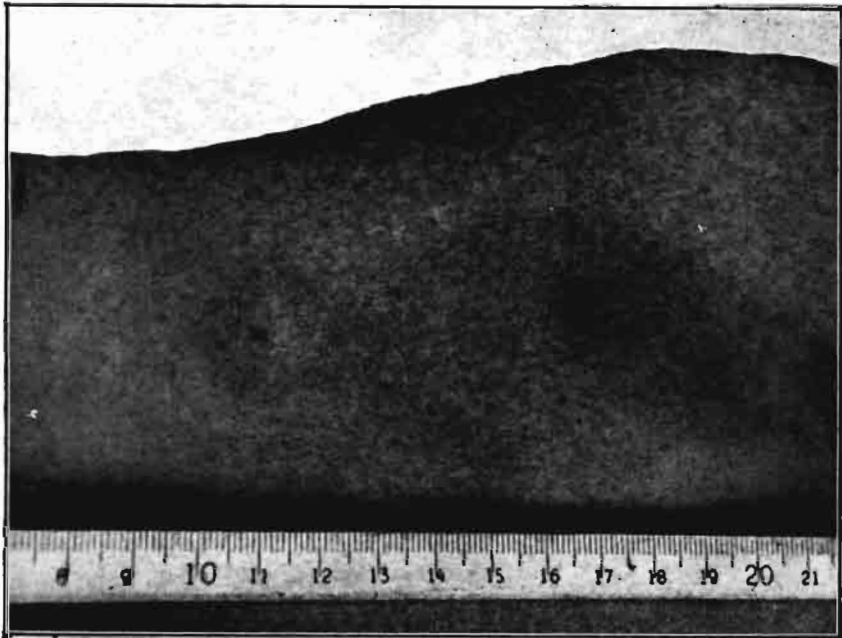


Fig. 2 — Fotografia da face anterior do antebraço com duas intradermo-reações.

A esquerda: reação a antígeno de *E. moshkovskii*.

A direita: forte reação a antígeno de *E. histolytica*.

siderada positiva. Observações por nós realizadas, concernentes em especial às reações provocadas por injeção intradérmica do testemunho, levaram-nos a fixar em 5 mm o referido limite inferior. Do próprio modo como foi esta belecido, segue que este valor, por si só, não devia ser considerado como um critério absoluto que invariavelmente permitisse enquadrar um resultado no grupo dos positivos ou no grupo dos negativos. Sempre que uma reação se manifestava por um eritema com dimensão muito próxima de 5 mm, havia de nossa parte relutância em consigná-lo a um ou outro grupo. Em tais circunstâncias lançamos mão de meios auxiliares, como, por exemplo, a presença de edema. Em certos casos, entretanto, por maiores que fôssem os esforços dispendidos, não era possível enquadrar o resultado num específico grupo e éramos forçados a assinalá-lo como duvidoso (\pm). Isto aconteceu em 6 das 153 provas (3,92%) realizadas com antígeno de *E m*, em 10 das 156 provas (6,41%) realizadas com antígeno de *E h*, e, conseqüentemente, em 16 das 309 provas (5,17%) a que se submeteram os nossos 141 pacientes (v. tabela I, pg. 52 a 58).

Encerrando estas considerações, assinalemos, ainda, os seguintes fatos de interesse. As injeções eram pouco dolorosas, exceção feita da realizada com o testemunho de mertiolato que provocava sensação fugaz de ardor. Os pacientes não acusaram febre ou qualquer perturbação geral. Nas reações muito intensas, havia, no local, calor, dor espontânea exacerbada pela pressão e, por vezes, prurido.

3 - DIAGNÓSTICO COPROLÓGICO DA AMEBÍASE

Seria indispensável para nossa tese que conseguíssemos elevado padrão no diagnóstico da amebíase, pois, se um nosso objetivo era conhecer o valor da I R na diagnose dessa moléstia, o sucesso desse propósito dependia estritamente da classificação dos pacientes em amélicos e não amélicos, por meio de métodos de comprovado valor. Só assim poderíamos contar com base segura para avaliar o mérito da prova intradérmica. Elegemos como método diagnóstico da amebíase o mais convincente e mais largamente empregado, que consiste em pesquisar a *E h* nas fezes. Indivíduos com e sem sintomatologia da moléstia foram estudados cuidadosamente. Como, em geral dispuséssemos de pacientes

emitindo fezes formadas, encontrávamos, normalmente, nos casos positivos, cistos da ameba patogênica.

Ao procurarmos fixar um esquema diagnóstico, tivemos em vista as falhas da pesquisa do parasita nas fezes, falhas que tentamos anular ou tornar desprezíveis.

Os seguintes fatos foram considerados atentamente:

- 1ª - a eliminação dos cistos não se faz com regularidade, estando, parece, sujeita a ciclos; seu número, nas fezes de um portador, foi estudado por Kofoid *et al.* (1919), variando de 330.000 a ... 45.000.000, por dia, durante os 26 dias em que foram feitos os exames;
- 2ª - a distribuição da *E h* não é homogênea na matéria fecal, podendo as amebas estar ausentes em certas porções e ser numerosas, em outras; êste fator é de importância, dada a pequena quantidade de material usado nos exames;
- 3ª - a *E h* pode ser confundida com relativa facilidade com outros parasitas existentes nas fezes.

As falhas ocasionadas pelo 1ª e 2ª fatores são de monta, e, desde há muito, se vem tentando vencê-las, seja pela repetição, em dias diferentes, dos exames de fezes, seja pelo emprêgo de métodos de enriquecimento. Entre êstes, citemos o de Faust e colaboradores (processo da centrífugo-flutuação em solução de sulfato de zinco), de largo emprêgo, por suas notórias vantagens.

Apesar de sua eficiência, um só exame por tal método revelou, entre nós, na experiência de Amaral *et al.* (1947), apenas cêrca de 50% dos comprovadamente parasitados pela *E h*.

A repetição dos exames negativos em dias sucessivos tem contribuído para atenuar as falhas do exame único. O número de vêzes que o método de Faust *et al.* deve ser repetido, nos casos negativos, para que o resultado seja de alto valor diagnóstico e retrate com maior fidedignidade a prevalência da amebíase, tem sido objeto de discussão, e, sôbre o assunto, perduram ainda discordâncias entre os autores. De um modo geral, podemos tomar como 6, em média, o número de tais exames exigidos por vários estudiosos, dentre os quais se alinham, com sua larga experiência, Faust (1941) e Amaral *et al.* (1947).

Além da repetição, existe outra prática que melhora sensivelmente o rendimento do exame de fezes. Consiste ela em provocar artificialmente a emissão de fezes líquidas ou diarréicas, nas quais as formas trofozoíticas são encontradas com maior frequência do que as císticas em fezes formadas. Para a consecução dessa finalidade, têm-se aplicado aos pacientes catárticos salinos (preferivelmente o sulfato de sódio), sais biliares, enema de soro fisiológico e injeção de emetina.

Um único exame em fezes diarréicas obtidas após administração de purgativo salino, que é o processo mais empregado entre os acima mencionados, apresentou sempre, em experiências realizadas por diversos autores sob condições várias, maior eficiência do que a de qualquer método diagnóstico executado uma só vez, sendo que, na experimentação já citada de Amaral *et al.* (1947), a percentagem de positividade por ele revelada, nos indivíduos que se demonstrava serem infectados, foi de 87,5%.

O exame de fezes diarréicas deve, porém, ser efetuado dentro de 15 minutos, no máximo, após sua emissão, pois os trofozoítos cedo se alteram, principalmente se não forem mantidos à temperatura de 37° C. Considere-se ainda que, a fresco, o diagnóstico diferencial dos trofozoítos das diferentes amebas é frequentemente impossível, pois os dados morfológicos, característicos da motilidade e dos pseudópodes, natureza das inclusões, visibilidade do núcleo, têm valor relativo. A presença de eritrócitos no interior de trofozoítos seria valioso elemento para que se firmasse o diagnóstico de *E h* mas, em fezes líquidas obtidas propositada e artificialmente pela administração de purgativo, as formas vegetativas da ameba patogênica se apresentam sem eritrócitos, prestando-se à confusão com trofozoítos de outros amebídeos intestinais. Nessas condições, o diagnóstico só poderá ser firmado com segurança após exame do material fixado e corado pela hematoxilina. O exame de fezes emitidas após emprego do catártico é, como se vê, mais trabalhoso do que o executado em fezes formadas. Suas vantagens, já apontadas, para o diagnóstico da amebíase são, porém, de tal ordem, que hoje ele é, na clínica, empregado com relativa frequência.

Nesta ordem de idéias, convém ainda considerar outro fator que interfere de forma significativa no diagnóstico da amebíase, quando o meio adotado é o exame de fezes. Queremos referir-nos à capacidade técnica do laboratorista, sabido que as confusões da *E h* com outros elementos encontrados nas fezes são frequentes e mesmo desastrosas. Os erros, neste particular, têm sido tantos, e de tal natureza, que levaram Craig (1948) a afirmar que "seria incapaz de acreditar nêles, se não os tivesse visto". Faust (1942), com a autoridade de seu nome, asseverava que, nos Estados Unidos, não existia uma centena de bons diagnosticadores de protozoários nas fezes. Esse autor julga necessário pelo menos seis meses de treinamento intensivo para que um inteligente técnico de laboratório adquira independência e segurança no diagnóstico dos diferentes protozoários intestinais.

Esta série de considerações, ainda que sumárias, indica claramente que quando se deseja diagnosticar com acêto a amebíase por meio do exame de fezes, como era necessário que o fizéssemos, certas medidas acauteladoras devem ser postas em prática. No presente trabalho, a esse aspecto foi atribuída a consideração que lhe era devida. As dificuldades relacionadas com a capacidade técnica do microscopista foram facilmente vencidas, graças ao Prof. Dácio Amaral, cuja colaboração foi de importância ímpar para a execução deste trabalho.

Deveríamos ainda estabelecer um esquema para o diagnóstico coprológico que diminuisse ou anulasse as demais causas de falha já anteriormente apontadas. Consideramos, de pronto, o valor relativo dos dois métodos mais empregados para o exame de fezes, ou seja, a pesquisa de cistos em fezes formadas e a de trofozoítos em material liqüefeito obtido pela administração de purgativo salino. Pesaros suas vantagens e desvantagens e finalmente adotamos o esquema de exame misto, empregado e preconizado por Amaral (1951): um exame em fezes formadas, pelos métodos de sedimentação e de Faust e col.; um exame a fresco em fezes liqüefeitas obtidas pela administração de purgativo (sulfato de sódio) e outro após coloração pela hematoxilina férrica; no caso de fezes liqüefeitas, o material da segunda evacuação do paciente era imediatamente examinado em microscópio com platina aquecida, para fins de orienta

ção, mas o diagnóstico definitivo só era estabelecido em material corado pela laca férrica.

Muitos pacientes, nos quais o diagnóstico de amebíase já era firmado pelo método de Faust *et al.*, não receberam o catártico. Outros, porém, mesmo nessas condições, isto é, com exame positivo pelo processo de Faust *et al.*, recebiam o purgativo. Essa prática é desnecessária e trabalhosa. Era feita, porém como rotina, com o objetivo de obter dados para a elaboração de outro estudo, não relacionado com o presente, em presidiários da Penitenciária do Estado, muitos dos quais, aliás, estão incluídos no presente trabalho.

Cumpra ainda, para finalizar estas linhas sobre o diagnóstico coprológico, considerar a eficiência do esquema por nós adotado para o diagnóstico da amebíase intestinal. Um exame em fezes formadas pelo método praticado, vimos já, revela cerca de 50% dos demonstradamente parasitados pela *E h.* Um único exame em material liqüefeito artificialmente pela ação do catártico, sob coloração pela hematoxilina férrica, diagnostica 87,5% dos parasitados, segundo a experiência já citada de Amaral *et al.* (1947) Seria importante conhecer qual a eficiência da combinação desses 2 métodos, norma de diagnóstico por nós adotada, ou seja, entre pacientes realmente com *E h.*, qual a porcentagem que seria revelada por meio de um exame em fezes formadas pelo processo de Faust *et al.* e, se negativo, por outro em fezes liqüefeitas obtidas após administração de purgativo salino. Recentemente, Amaral (1951) assevera que, pelo emprêgo de tal esquema, é revelada praticamente a totalidade dos parasitados. Foi em vista deste fato que adotamos a orientação aqui descrita.

4 - MATERIAL HUMANO

Embora evidente, nunca será demasiado encarecer a importância do material humano no estudo a que nos propusemos. Seria, naturalmente, indispensável que trabalhássemos com pacientes amebianos e não amebianos em número suficiente para permitirem o imprescindível estudo estatístico dos resultados obtidos.

Uma vez que era de se esperar, logicamente, que certas características individuais, como sexo, idade, condi-

ção social e outras semelhantes, nenhuma interferência tivessem sobre as eventuais relações dos resultados das I R e os dos exames de fezes, pareceram-nos desprovidos de significado maiores preocupações no tocante a estes atributos, quando da constituição da amostra a ser trabalhada. Em contraposição, achamos de bom alvitre, afastar certas condições que poderiam perturbar a reatividade cutânea aos antígenos em estudo, no que procuramos ser exigente, sobretudo porque a I R, na amebíase, é ainda prova praticamente desconhecida. Dessa forma, nossa amostra foi constituída por 141 indivíduos afebris, sem moléstias intercorrentes notórias e com estado geral satisfatório. Os poucos pacientes do sexo feminino não estavam em menopausa, em período de gestação ou de puerpério ou em fase de menstruação. Excluímos ainda os indivíduos de raça negra, pelas dificuldades conhecidas que a pigmentação da pele oferece à leitura de provas cutâneas.

Apenas dois pacientes (casos nºs. 51 e 111 da tabela I, pg. 52 a 58) apresentavam disenteria aguda, com formas hematófagas da *E h.* Quanto à idade, eram todos, exceção feita de um menor de 10 anos, indivíduos de 18 a 55 anos. Apesar do estado geral satisfatório, muitos dos examinados apresentavam queixas que poderiam estar relacionadas com a infecção amebiana; entretanto, devido à dificuldade e incerteza de estabelecer este nexó causal, tais dados não foram tomados em consideração para a interpretação dos resultados obtidos com a I R. Em certos casos havia maiores indícios de amebíase progressiva, pela informação de surtos disentéricos ou diarréicos ou pela referência a exame de fezes positivos; embora tais dados pudessem constituir elemento valioso para a interpretação dos resultados da I R, também não os levamos em consideração, preferindo aternos a fatos sobre os quais não pudessem pairar dúvidas e estes, no caso, foram os nossos próprios achados, no momento da investigação.

* * * * *

CAPÍTULO III

ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS EXPERIMENTAIS

1 - ANÁLISE ESTATÍSTICA (*)

Ao término da introdução dêste nosso trabalho, estátuímos que a finalidade precípua por êle visada residia em perquerir as relações porventura existentes entre a presença de *E h* nas fezes humanas e a reatividade cutânea à injeção de antígeno amebiano.

Para atingir tal objetivo, o material de estudo consistiu de 141 pessoas, com as especificações já expostas.

Em todos os examinados foi executada, seguindo as normas já anteriormente apontadas, a pesquisa da *E h* nas fezes, tendo-se verificado que em 53 dêles, ou seja em 36,30% dos casos, o exame coprológico revelou a presença de formas da ameba patogênica.

Quanto à prova intradérmica, em alguns dos pacientes, foi ela realizada utilizando-se uma ou mais partidas de antígeno de *E h* somente; em um segundo grupo, o material injetado provinha de partidas de *E h*, e, por último, um terceiro grupo foi submetido, simultâneamente, a provas com um ou mais antígenos tanto de *E m* quanto de *E h*.

Finalmente, no que concerne ao testemunho, é preciso ter presente como evoluíram os trabalhos neste sentido. Num primeiro grupo realizaram-se provas intradérmi-

(*) - Para a execução desta análise, contamos com a valiosa colaboração do Departamento de Bioestatística da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo. (Diretor do Departamento: Prof. Dr. Pedro Egydio de Oliveira Carvalho).

cas com *E m* e testemunho dado pelo veículo empregado na extração dos antígenos, isto é, por uma solução de mertiolato a 1 por 10.000 em sôro fisiológico; seguiu-se um grupo em que se testavam antígeno de *E m* e *E h* ainda com testemunho dado pela solução de mertiolato; foi depois introduzido o uso de testemunho constituído por extrato dos germes associados às culturas de *E h*, servindo, então, para contrôlle de reações tanto com antígenos de *E h* como de *E m*; finalmente, em certos casos, foi também utilizado como contrôlle, extrato das bactérias associadas à *E m*, usado em conjunto com o testemunho contendo germes associados à *E h*, em provas que utilizaram antígenos de uma e outra das amebas.

A falta de unicidade do critério de experimentação nas diferentes unidades do grupo pode parecer inexplicável, se não se atentar para o fato de que o presente trabalho constitui um conjunto de investigações que evoluíram à base de conhecimentos que iam sendo progressivamente adquiridos através d'ele próprio. Assim, da experimentação com *E m* passou-se às provas com *E h*; igualmente, de testemunhos menos representativos passou-se àqueles que melhor poderiam evidenciar reações cutâneas imputáveis aos componentes não amebianos presentes nos antígenos de prova. A decorrência inevitável da pesquisa, em terreno ainda pouco perlustrado, a impossibilidade de realizar um planejamento perfeito, pois êste, obviamente, se assenta em conhecimentos anteriormente estabelecidos.

Postas estas considerações preliminares, relacionamos, na tabela I (pg. 52 a 58), os resultados da procura de *E h* nas fezes e das manifestações das provas intra dérmicas, tanto com os antígenos amebianos quanto com os testemunhos, para cada um dos componentes do grupo estudado.

Para efeito de análise d'êste material, mister se fazia, desde logo, realizar uma série de tabulações. Foram tôdas elas feitas aproveitando sômente os casos em que, perante o critério classificador, se podia assegurar a negatividade da prova do testemunho.

O critério que se impôs, de início, para a consecução das referidas tabulações, foi o da proveniência do antígeno de prova. Surgia, porém, aqui uma dificuldade

T A B E L A I

RESULTADOS DAS PESQUISAS DE "E. HISTOLYTICA" NAS FEZES E DAS INTRADERMO-REAÇÕES COM ANTÍGENOS DE "E. MOSHKOVSKII" E DE "E. HISTOLYTICA"

Caso nº	E h nas fezes	Intradermo-reações realizadas com																		
		antígeno de "E. moshkovskii"							antígeno de "E. histolytica"								testemunho			
		Número da partida															Mertio lato	Bacteriano		
		I	II	III	IV	V	VI	VII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII		de E h	de E m	
1	-	-																-		
2	-	-																-		
3	-	+																-		
4	+	+																-		
5	+	+																-		
6	-	±																-		
7	+	+																-		
8	-	±																-		
9	-	-																-		
10	-	-																-		
11	-	-																-		
12	-	-																-		
13	-	+																-		
14	-	+																-		
15	+	+																-		

E h = "E. histolytica"

E m = "E. moshkovskii"

(continua)

TABELA I (continuação)

Caso nº	E h nas fezes	Intradermo-reações realizadas com																			
		antígeno de "E. moshkovskii"								antígeno de "E. histolytica"								testemunho			
		Número da partida																Mertio lato	Bacteriano		
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	de E h	de E m				
16	-	+																-			
17	+	-																	-		
18	-	-																	-		
19	-	+																	-		
20	+	-																	-		
21	-	-																	-		
22	+	+																	-		
23	-	-																	-		
24	-	-	+																-		
25	-	-	-																-		
26	+	+	+																-		
27	-	-	-																-		
28	-		+																-		
29	-		-																-		
30	-		-																-		
31	+		-																-		
32	+		-																-		
33	+		+																-		
34	-		-																-		
35	-		+																+		
36	-		-																-		

(continua)

TABELA I (continuação)

Caso nº	E h nas fezes	Intradermo-reações realizadas com																		
		antígeno de "E. moshkovskii"							antígeno de "E. histolytica"								testemunho			
		Número da partida																		Mertio lato
I	II	III	IV	V	VI	VII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	de E h	de E m				
37	-		+															-		
38	-		-															-		
39	-		-															-		
40	-		-						-									-		
41	-		-						-									-		
42	+		+						+									-		
43	-			+					-			+						-		
44	+			+					+			+						-		
45	-			+					±			+						±		
46	-			-					-			-						-		
47	-			-					-			-						-		
48	+			-					-			-						-		
49	+			+					+			+						-		
50	+			-					-			-						-		
51	+			+					+			+						-		
52	-			-					-			-						-		
53	+			+					-			+						-		
54	-			-					-			-						-		
55	+			-							+	-						-		
56	+			+							+	+						-		
57	-			-							+	-						-		

(continua)

TABELA I (continuação)

Caso nº	E h nas fezes	Intradermo-reações realizadas com																		
		antígeno de "E. moshkovskii"								antígeno de "E. histolytica"								testemunho		
		Número da partida																Mertio lato	Bacteriano	
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	de E h	de E m			
58	+			-							+							-		
59	+			+							+	+						-		
60	+			+							+	+						-		
61	+			-							+	-						-		
62	+			-							+	+						-		
63	+			-							+	+						-		
64	+										-	+						-		
65	-		-							-								-		
66	-		+		-					-				-				-		
67	-		-		-					-				-				-		
68	+		-							-					-			-		
69	+		-			-								+	-			-		
70	+		-			-								-	-			-		
71	-		-			-								-	-			-		
72	-		±											-	-			-		
73	+		-							-				±				±		
74	-			-	-												-	-		
75	+			-	-												±	-		
76	+			±	-												+	-		
77	-			-	-												+	-		
78	-			-	-												±	-		

(continua)

T A B E L A I (continuação)

Caso nº	E h nas fezes	Intradermo-reações realizadas com																testemho		
		antígeno de "E. moshkovskii"							antígeno de "E. histolytica"							Mertio lato	Bacteriano			
		Número da partida								I	II	III	IV	V	VI		VII	VIII	de E h	de E m
I	II	III	IV	V	VI	VII														
79	-			-	-											-			-	
80	+			-			+									+			-	
81	-				-										-				-	
82	-				-										-				-	
83	-				-										-				-	
84	+				-										+	+			-	
85	+				-										-	-			±	
86	-				-										-				-	
87	+				+													+	-	
88	-				-													-	-	
89	-				+	-			+						+	-			-	
90	-				-													-	-	
91	-				-													-	-	
92	-				-													-	-	
93	-				-													±	-	
94	-																	-	-	
95	-																	-	±	
96	-																	-	-	
97	-																	-	-	
98	-																	-	±	
99	+																	+	-	

(continua)

TABELA I (continuação)

Caso nº	E h nas fezes	Intradermo-reações realizadas com																		
		antígeno de "E. moshkovskii"							antígeno de "E. histolytica"							testemunho				
		Número da partida														Mertiolato	Bacteriano			
I	II	III	IV	V	VI	VII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	de E h		de E m			
100	-						-							-					-	
101	+						+								+				-	
102	+						+								+				-	
103	+						+								+				+	
104	-						-								-				-	
105	-						-								-				-	
106	-						+								-				-	
107	-						+								+				+	
108	+														+	+			-	
109	+														+	+			-	
110	-						-						-		-				-	
111	+						+								+				+	
112	+														-	+			-	
113	-														+	+			+	-
114	-														+	+			-	-
115	+														+	+			+	+
116	-														+	+			-	-
117	-														-	-			-	-
118	-														+	+			-	-
119	-																		-	-
120	-																		+	-

(continua)

T A B E L A I (conclusão)

Caso nº	E h nas fezes	Intradermo-reações realizadas com																	
		antígeno de "E. moshkovskii"							antígeno de "E. histolytica"								testemunho		
		Número da partida															Mertio lato	Bacteriano	
		I	II	III	IV	V	VI	VII	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII		de E h	de E m
121	-						+									+		+	+
122	-						-									-		-	-
123	-						-									-		-	-
124	-						-									+		-	-
125	-						-									+		+	-
126	-						-									-		-	-
127	-						-									-		-	-
128	+						-									-		-	-
129	-						-									-		-	-
130	+						-									-		-	-
131	-						-									-		-	-
132	+						-									-		-	-
133	-						-									-		-	-
134	-						-									+		+	-
135	-						-									+		+	-
136	+						-									+		+	-
137	+						-									+		-	-
138	+						-									+		+	-
139	-						+									+		+	+
140	-						-									-		-	-
141	+						-									+		+	-

consistente em se catalogar o pequeno número de resultados duvidosos de reações intradérmicas; êste problema não nos pareceu solucionável a não ser optando pela exclusão de casos em tais condições, isto porque não só não dispúnhamos de elementos objetivos para incluí-los seja entre os positivos seja entre os negativos, como também devido a que o nosso próprio critério de classificação das leituras havia sido estabelecido em bases, até certo ponto, arbitrárias. Adotados tais pontos de vista, surgiram então os quadros constantes da linha 3 das tabelas II e III ... (pgs. 60 e 61)

Uma inspeção geral sôbre êstes quadros mostra, de pronto, que o critério classificador adotado conduz a sub-universos que não se prestam, todos, a uma análise adequada; atente-se, por exemplo, seja ao quadro concernente à partida I do antígeno de E_h (tabela III) em que figura tão somente um indivíduo com resultado positivo ao exame coprológico, seja ao relativo à partida III do antígeno da mesma ameba de que consta apenas um indivíduo com exame negativo nas fezes, seja, ainda, e principalmente, ao sub-universo da partida V do antígeno de E_m (tabela II), cujo tamanho é 4 e indeterminada a razão de positividade da E_h nas fezes nos indivíduos com I R positiva.

Estas considerações nos levam, sem qualquer esforço, à conclusão de que certos aspectos deriváveis da apreciação conjunta de tais quadros só podem ser tidos como indícios grosseiros de outras tantas realidades efetivas. Com esta ressalva em mente, digamos, então, que o confronto das linhas 4 e 5, ou o das linhas 6 e 7, das tabelas II e III, nos fala em favor de uma associação positiva entre as positivities das duas provas, cuja interrelação vimos buscando; efetivamente, o fato verifica-se em todos os sub-universos, exceção feita dos três sôbre cuja constituição pairam as restrições acima aludidas e do relativo à partida VII do antígeno de E_m .

Em face da pouquidade de elementos opinativos até o momento disponíveis e da circunstância de se empregar nas provas atinentes à partida VII do antígeno de E_m o mais adequado testemunho (extrato dos germes associados à E_m), a mencionada discrepância concernente a esta partida tinha de ser encarada como um elemento perturbador, de im-

T A B E L A I I

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DAS PESQUISAS DE "E. HISTOLYTICA" NAS FEZES COM OS DAS
INTRADERMO-REAÇÕES REALIZADAS COM VÁRIAS PARTIDAS DE ANTÍGENO DE "E. MOSHKOVSKII"

	Número das partidas de antígeno de "E. moshkovskii" e natureza dos testemunhos						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
	Mertiolato	Mertiolato ou bacte- riano E h	Mertiolato ou bacte- riano E h	Bacteriano de E h	Bacteriano de E h	Bacteriano de E h	Bacteriano de E m
	$\frac{F}{IR}$	$\frac{F}{IR}$	$\frac{F}{IR}$	$\frac{F}{IR}$	$\frac{F}{IR}$	$\frac{F}{IR}$	$\frac{F}{IR}$
	+	+	+	+	+	+	+
	-	-	-	-	-	-	-
	T	T	T	T	T	T	T
	6	3	7	1	0	4	0
	5	4	1	1	0	1	1
	12	13	8	15	2	9	17
	14	18	9	18	4	9	24
	25	25	25	20	4	14	25
	8	8	15	4	2	4	7
	17	17	10	16	2	10	18
	25	25	25	20	4	14	25
Razão de positividade da IR nos indivíduos com F +	$\frac{6}{8} = 0,750$	$\frac{3}{8} = 0,375$	$\frac{7}{15} = 0,467$	$\frac{1}{4} = 0,250$		$\frac{4}{4} = 1,000$	$\frac{0}{7} = 0,000$
Razão de positividade da IR nos indivíduos com F -	$\frac{5}{17} = 0,294$	$\frac{4}{17} = 0,235$	$\frac{1}{10} = 0,100$	$\frac{1}{16} = 0,065$		$\frac{1}{10} = 0,100$	$\frac{1}{18} = 0,056$
Razão de positividade de F nos indivíduos com IR +	$\frac{6}{11} = 0,545$	$\frac{3}{7} = 0,429$	$\frac{7}{8} = 0,875$	$\frac{1}{2} = 0,500$		$\frac{4}{5} = 0,800$	$\frac{0}{1} = 0,000$
Razão de positividade de F nos indivíduos com IR -	$\frac{2}{14} = 0,143$	$\frac{5}{18} = 0,278$	$\frac{8}{17} = 0,471$	$\frac{3}{18} = 0,167$		$\frac{0}{9} = 0,000$	$\frac{7}{24} = 0,292$

E h = "E. histolytica" E m = "E. moshkovskii" F = "E. histolytica" nas fezes IR = Intradermo-reação T = Total

T A B E L A III

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DAS PESQUISAS DE "E. HISTOLYTICA" NAS FEZES COM OS DAS
INTRADERMO-REAÇÕES REALIZADAS COM VÁRIAS PARTIDAS DE ANTÍGENO DE "E. HISTOLYTICA"

	Número das partidas de antígeno de "E. histolytica" e natureza dos testemunhos																																																																																																																																																																							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII																																																																																																																																																																
	Mertiolato	Mertiolato	Mertiolato	Mertiolato ou bacte- riano E h	Bacteriano de E h	Bacteriano de E h	Bacteriano de E h	Bacteriano de E h																																																																																																																																																																
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">F</td> <td style="border: none;">+</td> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">T</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">IR</td> <td style="border: none;">+</td> <td style="border: none;">0</td> <td style="border: none;">1</td> <td style="border: none;">1</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">+</td> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">1</td> <td style="border: none;">6</td> <td style="border: none;">7</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">T</td> <td style="border: none;">1</td> <td style="border: none;">7</td> <td style="border: none;">8</td> <td style="border: none;"></td> </tr> </table>		F	+	-	T	IR	+	0	1	1	+	-	1	6	7	T	1	7	8		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">F</td> <td style="border: none;">+</td> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">T</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">IR</td> <td style="border: none;">+</td> <td style="border: none;">3</td> <td style="border: none;">0</td> <td style="border: none;">3</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">3</td> <td style="border: none;">5</td> <td style="border: none;">8</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">T</td> <td style="border: none;">6</td> <td style="border: none;">5</td> <td style="border: none;">11</td> <td style="border: none;"></td> </tr> </table>		F	+	-	T	IR	+	3	0	3	-	-	3	5	8	T	6	5	11		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">F</td> <td style="border: none;">+</td> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">T</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">IR</td> <td style="border: none;">+</td> <td style="border: none;">8</td> <td style="border: none;">1</td> <td style="border: none;">9</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">1</td> <td style="border: none;">0</td> <td style="border: none;">1</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">T</td> <td style="border: none;">9</td> <td style="border: none;">1</td> <td style="border: none;">10</td> <td style="border: none;"></td> </tr> </table>		F	+	-	T	IR	+	8	1	9	-	-	1	0	1	T	9	1	10		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">F</td> <td style="border: none;">+</td> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">T</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">IR</td> <td style="border: none;">+</td> <td style="border: none;">11</td> <td style="border: none;">1</td> <td style="border: none;">12</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">4</td> <td style="border: none;">12</td> <td style="border: none;">16</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">T</td> <td style="border: none;">15</td> <td style="border: none;">13</td> <td style="border: none;">28</td> <td style="border: none;"></td> </tr> </table>		F	+	-	T	IR	+	11	1	12	-	-	4	12	16	T	15	13	28		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">F</td> <td style="border: none;">+</td> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">T</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">IR</td> <td style="border: none;">+</td> <td style="border: none;">2</td> <td style="border: none;">1</td> <td style="border: none;">3</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">1</td> <td style="border: none;">8</td> <td style="border: none;">9</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">T</td> <td style="border: none;">3</td> <td style="border: none;">9</td> <td style="border: none;">12</td> <td style="border: none;"></td> </tr> </table>		F	+	-	T	IR	+	2	1	3	-	-	1	8	9	T	3	9	12		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">F</td> <td style="border: none;">+</td> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">T</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">IR</td> <td style="border: none;">+</td> <td style="border: none;">1</td> <td style="border: none;">0</td> <td style="border: none;">1</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">3</td> <td style="border: none;">3</td> <td style="border: none;">6</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">T</td> <td style="border: none;">4</td> <td style="border: none;">3</td> <td style="border: none;">7</td> <td style="border: none;"></td> </tr> </table>		F	+	-	T	IR	+	1	0	1	-	-	3	3	6	T	4	3	7		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">F</td> <td style="border: none;">+</td> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">T</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">IR</td> <td style="border: none;">+</td> <td style="border: none;">8</td> <td style="border: none;">4</td> <td style="border: none;">12</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">1</td> <td style="border: none;">15</td> <td style="border: none;">16</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">T</td> <td style="border: none;">9</td> <td style="border: none;">19</td> <td style="border: none;">28</td> <td style="border: none;"></td> </tr> </table>		F	+	-	T	IR	+	8	4	12	-	-	1	15	16	T	9	19	28		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td style="border: none;"></td> <td style="border: none;">F</td> <td style="border: none;">+</td> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">T</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">IR</td> <td style="border: none;">+</td> <td style="border: none;">2</td> <td style="border: none;">3</td> <td style="border: none;">5</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">-</td> <td style="border: none;">1</td> <td style="border: none;">8</td> <td style="border: none;">9</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">T</td> <td style="border: none;">3</td> <td style="border: none;">11</td> <td style="border: none;">14</td> <td style="border: none;"></td> </tr> </table>		F	+	-	T	IR	+	2	3	5	-	-	1	8	9	T	3	11	14	
	F	+	-	T																																																																																																																																																																				
IR	+	0	1	1																																																																																																																																																																				
+	-	1	6	7																																																																																																																																																																				
T	1	7	8																																																																																																																																																																					
	F	+	-	T																																																																																																																																																																				
IR	+	3	0	3																																																																																																																																																																				
-	-	3	5	8																																																																																																																																																																				
T	6	5	11																																																																																																																																																																					
	F	+	-	T																																																																																																																																																																				
IR	+	8	1	9																																																																																																																																																																				
-	-	1	0	1																																																																																																																																																																				
T	9	1	10																																																																																																																																																																					
	F	+	-	T																																																																																																																																																																				
IR	+	11	1	12																																																																																																																																																																				
-	-	4	12	16																																																																																																																																																																				
T	15	13	28																																																																																																																																																																					
	F	+	-	T																																																																																																																																																																				
IR	+	2	1	3																																																																																																																																																																				
-	-	1	8	9																																																																																																																																																																				
T	3	9	12																																																																																																																																																																					
	F	+	-	T																																																																																																																																																																				
IR	+	1	0	1																																																																																																																																																																				
-	-	3	3	6																																																																																																																																																																				
T	4	3	7																																																																																																																																																																					
	F	+	-	T																																																																																																																																																																				
IR	+	8	4	12																																																																																																																																																																				
-	-	1	15	16																																																																																																																																																																				
T	9	19	28																																																																																																																																																																					
	F	+	-	T																																																																																																																																																																				
IR	+	2	3	5																																																																																																																																																																				
-	-	1	8	9																																																																																																																																																																				
T	3	11	14																																																																																																																																																																					
Razão de positividade da IR nos indivíduos com F +	$\frac{0}{1} = 0,000$	$\frac{3}{6} = 0,500$	$\frac{8}{9} = 0,889$	$\frac{11}{15} = 0,733$	$\frac{2}{3} = 0,667$	$\frac{1}{4} = 0,250$	$\frac{8}{9} = 0,889$	$\frac{2}{3} = 0,667$																																																																																																																																																																
Razão de positividade da IR nos indivíduos com F -	$\frac{1}{7} = 0,143$	$\frac{0}{5} = 0,000$	$\frac{1}{1} = 1,000$	$\frac{1}{13} = 0,077$	$\frac{1}{9} = 0,111$	$\frac{0}{3} = 0,000$	$\frac{4}{19} = 0,211$	$\frac{3}{11} = 0,273$																																																																																																																																																																
Razão de positividade de F nos indivíduos com IR +	$\frac{0}{1} = 0,000$	$\frac{3}{3} = 1,000$	$\frac{8}{9} = 0,889$	$\frac{11}{12} = 0,917$	$\frac{2}{3} = 0,667$	$\frac{1}{1} = 1,000$	$\frac{8}{12} = 0,667$	$\frac{2}{5} = 0,400$																																																																																																																																																																
Razão de positividade de F nos indivíduos com IR -	$\frac{1}{7} = 0,143$	$\frac{3}{8} = 0,375$	$\frac{1}{1} = 1,000$	$\frac{4}{16} = 0,250$	$\frac{1}{9} = 0,111$	$\frac{3}{6} = 0,500$	$\frac{1}{16} = 0,063$	$\frac{1}{9} = 0,111$																																																																																																																																																																

E h = "E.histolytica" F = "E.histolytica" nas fezes I R = Intradermo-reação T = Total

portância relativa não desprezível, na edificação da conjuntura sugerida pelos outros dados, quanto à existência da referida associação positiva.

Diante de tal estado de coisas, é claro, então, que um nosso qualquer pronunciamento sobre a tese, objeto deste estudo, tinha de se fundamentar em novos subsídios, questão esta que, por seu turno, pressupunha o problema de saber como obtê-los. A nós, pareceu que a solução deste último era simples e espontânea. Em realidade, pôsto que na preparação das diversas partidas dos antígenos de *E m* de um lado e de *E h* de outro, procurássemos manter a máxima uniformidade, partindo das mesmas cêpas de cada um dos protozoários, pareceu-nos lícito admitir, como firmada, em cada caso, a identidade de umas e de outras, e consequentemente aceitar, a legitimidade da análise das relações nos universos da *E m*, sem qualquer especificação e da *E h*, também sem qualquer especificação. Ao se pôr em prática tal princípio, naturalmente, cada indivíduo, ainda que tivesse recebido antígeno proveniente de mais de uma partida ou de *E m* ou de *E h*, tinha de ser computado como uma única unidade. Surgiu, com isto, uma dificuldade consistente em se catalogar os pacientes nos quais não havia concordância nas respostas aos diversos antígenos de cada uma das amebas. Este empecilho foi por nós removido, adotando como critério dentro de cada sub-universo dos antígenos de *E m* e de *E h* o de se considerar a prova como positiva desde que tal fôsse o resultado da I R com ao menos um dos antígenos. Tal proceder foi ditado pela observação sedida a experimentadores afeitos ao preparo de antígenos a partir de protozoários, consistente na dificuldade de obter uma atividade antigênica constante; esta observação, aliás, encontra nos nossos próprios dados uma justificativa de presunção baseada não somente no fato de que um mesmo indivíduo recebendo mais de uma partida do mesmo antígeno não apresentava necessariamente a mesma reação a todos êles (ver tabela I), como na grande variabilidade de positividade da I R, em indivíduos com *E h* nas fezes, observada empregando diversas partidas do mesmo antígeno (ver a linha 3 das tabelas II e III)

Sob êstes critérios surgiram as tabelas IV e V ...
(pgs. 63 e 64)

T A B E L A I V

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DAS PESQUISAS DE "E. HISTOLYTICA" NAS FEZES COM OS DAS INTRADERMO-REAÇÕES REALIZADAS COM ANTÍGENO DE "E. MOSHKOVSKII"

	NATUREZA DOS TESTEMANHOS															
	Mertiolato				Bacteriano de "E.histolytica"				Bacteriano de "E.moshkovskii"				Qualquer			
	IR \ F	+	-	T	IR \ F	+	-	T	IR \ F	+	-	T	IR \ F	+	-	T
		+	15	9		24	+	5		3	8	+		0	1	1
-	10	24	34	-	6	25	31	-	7	17	24	-	23	66	89	
T	25	33	58	T	11	28	39	T	7	18	25	T	43	79	122	
Razão de positividade da IR nos indivíduos com F +	$\frac{15}{25} = 0,600$				$\frac{5}{11} = 0,455$				$\frac{0}{7} = 0,000$				$\frac{20}{43} = 0,465$			
Razão de positividade da IR nos indivíduos com F -	$\frac{9}{33} = 0,273$				$\frac{3}{28} = 0,107$				$\frac{1}{18} = 0,056$				$\frac{13}{79} = 0,165$			
Razão de positividade de F nos indivíduos com IR +	$\frac{15}{24} = 0,625$				$\frac{5}{8} = 0,625$				$\frac{0}{1} = 0,000$				$\frac{20}{33} = 0,606$			
Razão de positividade de F nos indivíduos com IR -	$\frac{10}{34} = 0,294$				$\frac{6}{31} = 0,194$				$\frac{7}{24} = 0,292$				$\frac{23}{89} = 0,258$			
Coefficiente de associação de Yule	q = 0,60				q = 0,75				q = - 1				q = 0,63			
Coefficiente de associação de Tschuprow	$\sqrt{\frac{\chi^2}{n}} = 0,33$				$\sqrt{\frac{\chi^2}{n}} = 0,39$				$\sqrt{\frac{\chi^2}{n}} = 0,04$				$\sqrt{\frac{\chi^2}{n}} = 0,32$			
χ^2 com correção de Yates, se necessária	$\chi_c^2 = 5,00$				$\chi_c^2 = 3,91$				$\chi_c^2 = 0,27$				$\chi_c^2 = 12,75$			

F = "E. histolytica" nas fezes IR = Intradermo-reação T = Total

TABELA V

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DAS PESQUISAS DE "E. HISTOLYTICA" NAS FEZES COM OS DAS INTRADERMO-REAÇÕES REALIZADAS COM ANTÍGENO DE "E. HISTOLYTICA"

	Natureza dos testemmos														
	Mertiolato				Bacteriano de "E. histolytica"				Qualquer						
	F		+	-	T	F		+	-	T	F		+	-	T
	IR					IR					IR				
	+	12	2	14	+	10	5	15	+	22	7	29			
	-	2	6	8	-	6	35	41	-	8	41	49			
	T	14	8	22	T	16	40	56	T	30	48	78			
Razão de positividade da IR nos indivíduos com F+		$\frac{12}{14} = 0,857$				$\frac{10}{16} = 0,625$				$\frac{22}{30} = 0,733$					
Razão de positividade da IR nos indivíduos com F-		$\frac{2}{8} = 0,250$				$\frac{5}{40} = 0,125$				$\frac{7}{48} = 0,146$					
Razão de positividade da F nos indivíduos com IR+		$\frac{12}{14} = 0,857$				$\frac{10}{15} = 0,667$				$\frac{22}{29} = 0,759$					
Razão de positividade de F nos indivíduos com IR-		$\frac{2}{8} = 0,250$				$\frac{6}{41} = 0,146$				$\frac{8}{49} = 0,163$					
Coefficiente de associação de Yule		Q = 0,88				Q = 0,84				Q = 0,88					
Coefficiente de associação de Tschuprow		$\sqrt{\frac{\chi^2}{n}} = 0,61$				$\sqrt{\frac{\chi^2}{n}} = 0,52$				$\sqrt{\frac{\chi^2}{n}} = 0,59$					
χ^2 com correção de Yates, se necessária		$\chi^2_0 = 5,70$				$\chi^2_0 = 12,13$				$\chi^2_0 = 24,82$					

F = "E. histolytica" nas fezes . IR = Intradermo-reação T = Total

Da análise da tabela IV, depreendem-se:

- a) - entre a positividade do exame de fezes para *E h* e a positividade da reação intradérmica existe uma associação positiva quando foram empregados os testemunhos de mertiolato, dos germes associados à cultura de *E h* ou fazendo abstração da natureza do testemunho; as intensidades destas associações positivas, que estão medidas quer em termos de um máximo relativo (coeficiente de Yule), quer em termos de um máximo absoluto (coeficiente de Tschuprow) apresentam valores pouco discrepantes entre si; os valores obtidos para χ^2 são, nos três casos, significantes ao nível de 5% e, quando se faz a abstração da natureza do testemunho, o valor de χ^2 supera o valor crítico (6,635) ao nível de 1%;
- b) - no caso que faz exceção e que, paradoxalmente, é aquele em que se usou o testemunho mais representativo para o antígeno considerado, a associação negativa tem intensidade muito reduzida (0,04) quando medida em termos do máximo absoluto; note-se, além disto, que neste caso a hipótese de independência não pode ser rejeitada, em vista do valor obtido para χ^2 .

Dada a natureza do antígeno, mais importante para nós, é a análise constante da tabela V que se refere às I R realizadas com antígenos de *E h*. Pois bem, dela decorre que a associação estudada é sempre positiva com intensidades praticamente iguais e sempre superiores às verificadas em correspondência ao antígeno de *E m*; finalmente, em todos os casos a associação não deve ser imputada ao acaso, uma vez que os valores de χ^2 , em todos eles, superam o do ponto crítico ao nível 5% e nos dois últimos, o do ponto crítico ao nível de 1%. Dêstes resultados, merecem especial atenção os atinentes ao testemunho mais representativo às finalidades que se têm em vista, ou seja ao bacteriano de *E h*. Tendo presente este fato, procuramos, a partir de tal material, estimar as duas importantes características necessárias à apreciação do mérito da I R, quais sejam, a sensibilidade e a inespecificidade, definida a primeira como sendo a frequência relativa da positividade

da I R entre os que têm o exame coprológico positivo e a segunda pela frequência relativa da positividade da I R entre os que têm o exame coprológico negativo. Obtivemos então, utilizando da função B incompleta, os seguintes intervalos fiduciais 95%:

para a sensibilidade: 0,35 - 0,87 e
para a inespecificidade: 0,04 - 0,24

O aspecto mais saliente destes resultados é a amplitude considerável dos intervalos, o que, sem dúvida, está ligado ao número relativamente reduzido de casos disponíveis à sua determinação.

Finalmente, em relação ao problema já aludido no capítulo anterior, qual seja o de indagar das eventuais relações antigênicas entre a *E m* e a *E h*, através das manifestações da I R, organizamos a tabela VI (pg. 67), em que figuram indivíduos com reação negativa em um teste - munho ou em ambos, se tal fôr o caso, e submetidos simultaneamente à inoculação de antígenos de *E m* e de *E h*; no caso do indivíduo haver recebido mais de uma partida de antígeno de uma das amebas, considerou-se novamente a I R como positiva, desde que tal fôsse o resultado em ao menos uma das partidas.

Destes dados, dos quais os mais importantes são os relativos à terceira coluna, segue a existência de uma associação positiva entre resultados de mesmo sinal em I R realizadas com antígenos de *E m* e de *E h*; esta associação é de intensidade muito considerável, e os valores de χ^2 indicam não dever ela ser imputada ao acaso.

Este achado reforça, em muito, a veracidade da hipótese de semelhança antigênica das *E m* e *E h*, que já aventamos, à base da semelhança morfológica existente entre os dois organismos. Ainda mais, êle justifica, até certo ponto, a prática por nós inicialmente adotada de empregar antígeno de *E m* em provas intradérmicas, e, finalmente, pode servir de sugestão para novas investigações, em vista das vantagens que adviriam para o estudo imunológico da amebíase caso pudéssemos substituir antígeno de *E h* por de *E m*, como já encarecemos.

TABELA VI

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DAS INTRADEEMO-REAÇÕES REALIZADAS COM OS ANTÍGENOS DE "E. HISTOLYTICA" E DE "E. MOSHKOVSKII"

	Resultados das pesquisas de "E. histolytica" nas fezes								
	Positivo			Negativo			Qualquer		
	$\begin{array}{c cc} \text{IEh} & + & - \\ \hline \text{IEm} & & \end{array}$	$\begin{array}{c cc} & + & - \\ \hline & & \end{array}$	T	$\begin{array}{c cc} \text{IEh} & + & - \\ \hline \text{IEm} & & \end{array}$	$\begin{array}{c cc} & + & - \\ \hline & & \end{array}$	T	$\begin{array}{c cc} \text{IEh} & + & - \\ \hline \text{IEm} & & \end{array}$	$\begin{array}{c cc} & + & - \\ \hline & & \end{array}$	T
	$\begin{array}{c cc} & + & - \\ \hline + & 13 & 0 \\ \hline - & 8 & 7 \\ \hline T & 21 & 7 \end{array}$	$\begin{array}{c cc} & + & - \\ \hline + & 3 & 2 \\ \hline - & 3 & 38 \\ \hline T & 6 & 40 \end{array}$	$\begin{array}{c cc} & + & - \\ \hline + & 16 & 2 \\ \hline - & 11 & 45 \\ \hline T & 27 & 47 \end{array}$						
Razão de positividade da I E m nos indivíduos com I E h +	$\frac{13}{21} = 0,619$	$\frac{3}{6} = 0,500$	$\frac{16}{27} = 0,593$						
Razão de positividade da I E m nos indivíduos com I E h -	$\frac{0}{7} = 0,000$	$\frac{2}{40} = 0,050$	$\frac{2}{47} = 0,043$						
Razão de positividade da I E h nos indivíduos com I E m +	$\frac{13}{13} = 1,000$	$\frac{3}{5} = 0,600$	$\frac{16}{18} = 0,889$						
Razão de positividade da I E h nos indivíduos com I E m -	$\frac{8}{15} = 0,533$	$\frac{3}{41} = 0,073$	$\frac{11}{56} = 0,196$						
Coefficiente de associação de Yule	$Q = 1,00$	$Q = 0,90$	$Q = 0,94$						
Coefficiente de associação de Tschuprow	$\sqrt{\frac{\chi^2}{n}} = 0,54$	$\sqrt{\frac{\chi^2}{n}} = 0,49$	$\sqrt{\frac{\chi^2}{n}} = 0,62$						
χ^2 com correção de Yates	$\chi^2_0 = 5,79$	$\chi^2_0 = 6,76$	$\chi^2_0 = 25,28$						

I E h = Intradermo-reação com antígeno de "E. histolytica"

I E m = Intradermo-reação com antígeno de "E. moshkovskii"

T = Total

2 - C O M E N T Á R I O S

Terminada, assim, a análise estatística dos dados, podemos considerar como firmado o conceito da existência de uma associação entre os resultados da I R e da pesquisa da *E h* nas fezes.

Tal achado cria, desde logo, a sugestão do emprêgo da I R como meio diagnóstico da amebíase, atribuindo-se-lhe um significado que é obviamente função da sua sensibilidade e da sua especificidade.

Ficaram tais características determinadas acima, de forma quantitativa, em termos, porém, dos resultados das pesquisas de *E h* nas fezes, o que, à primeira vista, pode ser tomado como ponto de referência absoluto. Num melhor exame da questão, torna-se necessário, porém, que se façam restrições a tal juízo, das quais se colherão evidências favoráveis tanto à sensibilidade quanto à especificidade da I R.

Senão, vejamos, considerando, de início, a sensibilidade. O achado de formas amebianas com os caracteres morfológicos da *E h* nas fezes não equivale à certeza de localização tissular da ameba capaz de originar produção de anticorpos, bastando, para concretizar esta afirmativa, lembrar casos em que se depara com indivíduos nas fases iniciais da infecção. Relativamente a este particular, citemos a opinião de Shattuck (1951), segundo a qual são necessárias cêrca de duas semanas para o desenvolvimento de precipitinas e anticorpos fixadores do complemento no sangue de amebianos. A falta de equivalência acima referida ganharia, naturalmente, maior relêvo, caso viesse a ser confirmada a teoria defendida, entre outros, por Brumpt (1949) que admite, recordemos, a ocorrência de uma fase de comensalismo para a *E h*. É claro que, nestas circunstâncias, a falta de sensibilidade não é imputável a um demérito específico da prova, mas explicada em termos comuns a tôdas as reações antígeno/anticorpo. Outra causa que poderia afetar a sensibilidade da reação, tal como foi me

dida, e que precisa ser lembrada, embora desconhecendo-se a magnitude de sua ocorrência, é a que diz respeito a achados, em fezes humanas, de amebas de vida livre, morfológicamente indistinguíveis da *E h*. Em trabalho de que fomos co-autor, tentamos verificar a possibilidade de tal ocorrência relativamente à *E m* (Azzi Leal & Amaral, 1950); nessa experimentação é, entretanto, muito limitada para que possamos emitir juízo seguro sobre o assunto.

Muito mais ponderosos são os argumentos tendentes a mostrar que são concebíveis para a inespecificidade cifras inferiores à que foi estabelecida. Realmente, resultados negativos de exames de fezes não constituem certeza de inexistência de infecção amebiana.

Neste sentido, consignemos, em primeiro lugar, que, malgrado o grau de segurança do esquema por nós adotado para os exames coprológicos, êle não garante uma eficiência absoluta.

A seguir, podemos lembrar a possibilidade de persistência da positividade da I R em indivíduos atualmente curados, mas que, no passado, apresentaram uma infecção amebiana. É verdade que, sobre êste assunto, não se dispõe ainda de elementos seguros para um pronunciamento definitivo. Em desabono à aludida possibilidade fala, até certo ponto, a observação clínica de freqüentes reinfecções bem como as averiguações de Craig (1948); êste autor, trabalhando com a reação de fixação do complemento, demonstrou que esta prova se negativava em indivíduos que, após tratamento não mais apresentavam a *E h* à pesquisa nas fezes, e, isto, dentro de um prazo variável de 3 a 28 dias, sendo que o fato se verificava em 86,6% dos casos no fim da segunda semana; aliás, já em 1933, Craig & Kagy haviam verificado, experimentalmente, em cães, fato semelhante. É preciso, entretanto, não perder de vista o eventual comportamento distinto de anticorpos amebianos nas provas de fixação de complemento e intradérmica. Contradizendo, de certo modo, os resultados experimentais acima mencionados, cabe nova referência aos achados de Bieling (1935) nos quais foi verificada a persistência, por longo tempo, de alergia cutânea específica, em cães curados de infecção amebiana experimental, o que não acontecia em gatos, devendo, segundo opina o autor, à rápida evolução da doença nos

tes animais. Embora o nosso material não nos permita expender uma opinião objetiva sobre o assunto, parece legítimo, diante do exposto, asseverar que, até melhor esclarecimento da questão, é lícita a hipótese de que algumas reações inespecíficas traduzam uma infecção progressa.

Finalmente, em apóio à afirmativa feita, pela qual resultado negativo de exames de fezes não constitui certeza de ausência da infecção amebiana, citemos a existência de formas extra-intestinais da moléstia, primárias ou não, mas desacompanhadas da presença do parasita nas fezes. Não acreditamos, entretanto, que este fator tenha interferido nos nossos resultados.

À luz das informações obtidas, através do nosso material, quanto à sensibilidade e à especificidade da I R, não se pode pretender que esta prova constitua, de per si, um processo diagnóstico da amebíase capaz de competir com o fornecido pelo exame parasitológico de fezes, realizado em conformidade com os requisitos exigidos; aliás, julgamos mesmo lícito prever que esta situação perdurará, ainda que novos e mais numerosos dados experimentais venham a contribuir para a obtenção de valores mais satisfatórios quer da sensibilidade quer da especificidade.

Em nosso entender, o papel a atribuir à I R, como meio de diagnóstico individual, é subsidiário, e, sob este aspecto, comparável, por exemplo, ao desempenhado por provas sorológicas como a da reação de fixação do complemento de Izar-Craig.

Não é, entretanto, o objetivo diagnóstico, com sua conseqüente repercussão para a clínica, que nos parece caber à I R mas sim, - e isto é o que efetivamente importa no setor da nossa especialidade - cremos que se pode antever para ela um largo campo de aplicação em inquéritos epidemiológicos em que se vise estimar, com razoável precisão, a prevalência da protozoose, em grandes grupos populacionais.

O motivo fundamental desta presunção reside, a nos-

so ver, no fato de que o emprêgo da pesquisa coprológica da ameba, obedecendo aos requisitos que asseguram sua alta eficiência, é incompatível com as realidades práticas da rotina epidemiológica, efetivamente, o esquema ideal, com exames repetidos de fezes formadas, complementados, se necessário, por exame de material obtido após administração de purgativo salino, não pode ser obedecido, seja pelo que se exige do paciente, seja pelo vulto de trabalho envolvido. Como decorrência inevitável desta situação, os índices de prevalência da amebíase são obtidos à base de um único exame de fezes, na melhor das hipóteses executado pelo método de Faust *et al.* Foi esta, por exemplo, a prática adotada, entre nós, no amplo inquérito realizado em 1946, no município de Araraquara, pela Faculdade de Higiene e Saúde Pública (Departamento de Parasitologia). Ora, tal conduta, inteiramente aceitável na prática epidemiológica, permite-nos, segundo dados disponíveis na literatura, reconhecer apenas cêrca de 50% dos indivíduos que se pode demonstrar, por melhores esquemas diagnósticos, serem eliminadores de cistos de *E h* pelas fezes.

Em contraposição a êstes fatos indicativos de uma baixa sensibilidade da prática ora considerada, poder-se-ia atribuir à mesma, à primeira vista, uma especificidade absoluta, uma vez que se admita como desprezível a probabilidade de ocorrência de amebas de vida livre morfológica e tintorialmente indistinguíveis da *E h*. Esta concepção pode, entretanto, na prática, não corresponder à realidade, pelo simples fato do grau de especificidade depender da capacidade dos técnicos encarregados dos exames coprológicos. Embora a importância dêste aspecto já tenha sido considerada, parece-nos oportuno citar aqui, também, as recentes palavras com que Faust (1952) se refere novamente sôbre o assunto: "Until relatively recently there were only a few persons in the United States who were regarded as experts in the diagnosis of *E. histolytica* and even to day experts at times differ from one another in the interpretation of the more difficult diagnostic specimens" e, em outra passagem: "in the same community and even in the same class of the population, results have differed several-fold due to inequalities of sampling or of diagnostic ability".

Confrontando-se, de um lado, tudo quanto foi exposto concernente à contribuição que representa um único exame coprológico pelo método de Faust *et al.* para o estudo da amebíase, e, de outro lado, os resultados por nós obtidos com a I R, os quais, vimos, apresentam ainda perspectivas de serem melhorados, parece-nos lícito antever a possibilidade desta reação vir a substituir, em inquéritos epidemiológicos, o exame de fezes.

É claro que, se isto acontecesse, reduzir-se-ia apreciavelmente a massa de trabalho e facilitar-se-ia de muito o recrutamento de pessoal habilitado, pois é, sem dúvida, mais simples formar um técnico capaz de realizar a injeção do antígeno e a leitura da reação, do que instruí-lo para proceder a um exame correto das fezes, diagnosticando com acêrto as formas císticas da *E h*, porventura nelas existentes.

Se a substituição alvitrada do exame de fezes pela I R apresenta as vantagens que acabam de ser acenadas, não se pode, de outro lado, deixar de lhe reconhecer certos inconvenientes. A primeira desvantagem que poderia ser aventada do emprêgo da I R consiste na exigência de dois contatos do investigador com o paciente para proceder à injeção e posterior leitura da prova: êste argumento é de valor bastante relativo, pois, em geral, também no inquérito coprológico há uma dupla entrevista, uma para fornecimento do vasilhame e instruções, outra para entrega ou coleta do material. Uma segunda dificuldade, que talvez possa vir a surgir quando da realização de inquéritos através da I R, é a recusa dos pacientes em se submeterem à injeção do antígeno; tal óbice está, naturalmente, na dependência do nível de educação geral e sanitária da coletividade inquerida, mas, dadas as freqüentes surpresas que proporcionam as reações de comunidades frente a determinadas solicitações, dificilmente poder-se-ia ajuizar de quanto a importância destas recusas sobrepujaria a do fornecimento de material para o exame coprológico. Um último argumento que poderia ser invocado, em favor da manutenção da prática do exame de fezes, é o de proporcionar êste informações outras além das concernentes à amebíase; é inegável tal vantagem, se o interesse do investigador estiver voltado tanto para o estudo da amebíase como das demais parasitoses intestinais; em alguns de tais casos, em

tretanto, poder-se-ia considerar a hipótese de realizar o primeiro dos referidos estudos pela I R e o segundo por técnicas de exames de fezes menos refinadas, de fácil execução, mas satisfatórias para os fins específicos que então estariam em vista.

* _ * _ * _ * _ * _ *
* _ * _ * _ *
* _ *
*

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

Da argumentação expendida, e, dos resultados fornecidos pela experimentação e pela análise estatística, decorrem as conclusões abaixo.

I

Há elementos indicativos da existência de uma associação positiva entre resultados de mesmo sinal da pesquisa da *Endamoeba histolytica* nas fezes e da intradermo-reação realizada com antígeno de *Endamoeba moshkovskii*.

II

Há uma associação positiva entre resultados de mesmo sinal da pesquisa da *E. histolytica* nas fezes e da intradermo-reação com antígeno de *E. histolytica*; dentro dos critérios habituais de significância, esta associação não deve ser atribuída ao acaso; sua intensidade, determinada no conjunto dos casos em que foi empregado o mais adequado testemunho, exprime-se pelo valor de 0,84 do coeficiente de associação de Yule e pelo valor 0,52 do coeficiente de associação de Tschuprow.

III

Utilizando o mesmo conjunto de casos referidos na conclusão precedente, a sensibilidade observada para a intradermo-reação foi de 0,625 e a inespecificidade de 0,125, com intervalos fiduciais 95%, dados respectivamente por:

$$\begin{array}{l} 0,35 \quad - \quad 0,87 \quad e \\ 0,04 \quad - \quad 0,24 \end{array}$$

IV

Há argumentos de natureza teórica conducentes à perspectiva de melhoria dos valores estabelecidos para a sensibilidade e para a inespecificidade da intradermo-reação.

V

Há uma associação positiva e significativa entre resultados de mesmo sinal das intradermo-reações realizadas com antígeno de *E. histolytica* e de *E. moshkovskii*.

VI

A intradermo-reação pode vir a constituir o método fundamental para levantamentos epidemiológicos da prevalência da amebíase em agrupamentos humanos.

VII

Dada a importância da possibilidade sugerida na conclusão anterior, reputamos essencial que o assunto seja mantido como tema de investigação para que possam ser aprofundados e ampliados conhecimentos relativos a certos aspectos básicos da questão, especialmente os referentes à padronização do antígeno.

--*-*-*-*-*-*-*

B I B L I O G R A F I A

- AMARAL, A. D. F. 1944. Algumas contribuições do laboratório para o estudo da amebíase. Tese de docência-livre. São Paulo, Tip. Rossolillo.
- AMARAL, A. D. F. 1945. Nova modificação em meio de cultura para *Endamoeba histolytica*. An. Fac. Med. Univ. São Paulo, 21:175-86.
- AMARAL, A. D. F. 1951. Processos laboratoriais diretos e indiretos para o diagnóstico da amebíase. Folia Clinica et Biologica, 17 (2): 157-64.
- AMARAL, A. D. F. & AZZI LEAL, R. 1949. Sôbre uma endameba semelhante à *Endamoeba histolytica* encontrada em material de esgôto. Rev. Paulista Med., 34(3):173-76 e Anais do 7º Congresso Brasileiro de Higiene, 2:847-50, São Paulo.
- AMARAL, A. D. F., PONTES, J. F. & PIRES, C. D. A. 1947. Amebíase. São Paulo, Tip. Rossolillo.
- AZZI LEAL, R. & AMARAL, A. D. F. 1950. Novos estudos sôbre amebas encontradas em esgôto com referência especial a uma endameba (*E. moshkovskii*) semelhante à *Endamoeba histolytica*. Arq. Fac. Hig. S. Pùb. Univ. São Paulo, 4 (2): 125-33.
- BARROS BARRETO, J. 1951. Compêndio de Higiene. Rio de Janeiro, Editora Guanabara.
- BIELING, R. 1935. Experimentelle Untersuchungen über Amöbenruhr; die experimentell erzeugten Veränderungen und die Pathogenese der Amöbiasis. Arch. Schiffs- u. Tropenhyg. (Beil., 2), 39:1-60.

- BOZICEVICH, J. 1951. Immunological diagnosis of parasitic diseases. *In Parasitic Infections in Man.* Harry Most, ed. New York, Columbia University Press.
- BOECK, W.C. & DRBOHLAV, J. 1925. The cultivation of *Endamoeba histolytica*. *Am. J. Hyg.*, 5 (4): 371-407.
- BRUMPT, E. 1949. Précis de Parasitologie. Vol. I, 6a. ed. Paris, Masson & Cie.
- CHASE, M.W. 1952. The allergic state. *In Bacterial and Mycotic Infections of Man.* R. J. Dubos, ed. 2a. ed. Philadelphia, J.B. Lippincott Co.
- COCA, A.F. 1912. The separation of protozoan species by means of immunity reactions. *Ztschr. Immunitätsforsch. (Orig.)*, 12 (2): 127-33.
- CRAIG, C.F. 1948. Laboratory Diagnosis of Protozoan Diseases. 2a. ed., Philadelphia, Lea & Febiger.
- CRAIG, C.F. & KAGY, E. 1933. A study of complement fixation in experimental amebiasis in dogs. *Am. J. Hyg.*, 18 (1): 202-19
- CULBERTSON, J.T. 1941. Immunity Against Animal Parasites. New York, Columbia University Press.
- CULBERTSON, J.T. 1951. Immunological mechanisms in parasitic infections. *In Parasitic Infections in Man* Harry Most, ed. New York, Columbia University Press.
- CUTLER, D.W. 1918. A method for the cultivation of *Endamoeba histolytica* (Preliminary note). *J. Path. & Bact.*, 22:22-7.
- D'ANTONI, J.S. 1949. The pattern of the literature of amebiasis: 1932-1947. *Am. J. Trop. Med.*, 29:269-93.
- FAJARDO, F. 1896. Ueber amöbische Hepatitis und Enteritis in den Tropen (Brasilien). *Zentralbl. Bakt.*, 19(20):753-68.

- FAUST, E. C. 1941. Recent laboratory work throwing light on clinical amebiasis. *Rev. Gastroenterol.*, 8(3):197-203.
- FAUST, E. C. 1942. The prevalence of amebiasis in the Western Hemisphere. *Am. J. Trop. Med.*, 22:93-105.
- FAUST, E. C. 1952. Modern criteria for the laboratory diagnosis of amebiasis. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.*, 1(1):140-45.
- HEATHMAN, L. 1932. Studies of the antigenic properties of some free living and pathogenic amebas. *Am. J. Hyg.*, 16:97-123.
- IZAR, G. 1914. Studien über Amöbenenteritis. IV Mitteilung: Über das Vorkommen spezifischer Antikörper in Serum von Amöbenruhrkranken (*Entamoeba tetragena*). *Arch. Schiffs- u. Tropenhyg.*, (Beih. 2) 18:76-9.
- KOFOID, C. A., KORNHAUSES, S. I. & PLATE, J. T. 1919. In testinal parasites in overseas and home services troops of the U. S. Army with especial reference to carriers of amebiasis. *J. A. M. A.*, 72 (24):1721-24.
- MENENDEZ, P. E. 1932. Serological relationships of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Hyg.*, 15:785-808.
- MICHAELIS, W. 1930. Ueber Gewinnung und Reinzüchtung bakteriensteriler Amöben, sowie deren antigene Eigenschaften. *Zentralbl. Bakt.*, 117:298-311.
- RÖSSLE, R. 1905. Spezifische Sera gegen Infusorien. *Arch. Hyg.*, 54:1-31.
- SCALAS, L. 1921. Contributo allo studio della deviazione del complemento nella dissenteria amebica. *Riforma Med.*, 37:103-4.
- SCALAS, L. 1923. L'intradermoreazione nella dissenteria amebica. *Riforma Med.*, 39:967-69.

- SECRET, E. 1952. Tentative d'intradermoréaction pour le diagnostic de l'amebiase. Maroc Méd., 31(324):436-37.
- SCHUCKMANN, W. von 1920. Serologische Untersuchungen an Culturamöben. Klin Wchnschr., 1(7):545-47.
- SELLARDS, A.W. 1911. Immunity reactions with amoe - bae. Philipp. J. Sci., 6:281-98.
- SHATTUCK, G.C. 1951. Diseases of the Tropics. New York, Appleton-Century-Crofts, Inc.
- SPECTOR, B.K. 1932. A comparative study of cultural and immunological methods of diagnosing infections with *Entamoeba histolytica*. J. Prev. Med., 6:117-28.
- STONE, W.S. 1935. A method of producing encystment in cultures of *E. histolytica*. Am. J. Trop. Med., 15:681-84.
- TALIAFERRO, W.H. 1929. The Immunology of Parasitic Infections. New York, The Century Co.
- TSHALAIYA, L.E. 1941. Sôbre uma espécie de *Entamoeba* encontrada em efluente de esgôto. (*Traduzido do russo*). Med. Parasitol., Moscou, 10(2):244-52.
- WAGENER, E.H. 1924. A precipitating test in experimental amoebic dysentery in cats. Univ. California Pub. in Zool., 26:15-20.
- ZAUBITZER, H. 1901. Studien über eine dem Strohinfus entnommene Amöbe. Arch. Hyg., 40:103-41.

--*-*-*