

CONSIDERAÇÕES EM TÔRNO DA CULTURA DA ENDAMEBA HISTOLÍTICA

JOSÉ DA SILVA COSTA

Técnico de Laboratório do Instituto Adolfo Lutz

Entre muitos assuntos que têm servido de tema para demorados e exaustivos trabalhos dos estudiosos de parasitologia, destaca-se pela sua grande importância, a cultura da *Endameba histolítica*.

Desde longa data tem-se procurado realizar culturas desse microorganismo, que é responsável por uma série de perturbações da saúde humana.

Entre os trabalhos de valor que têm sido publicados sobre a cultura da *Endameba histolítica*, merecem especial menção os realizados no Instituto Adolfo Lutz, pelos Drs. Augusto de E. Taunay e Marcelo Osvaldo Álvares Corrêa e Sr. Gabriel Garcia de Figueiredo.¹

Reconhecida a possibilidade de se cultivar *in vitro*, a *Endameba histolítica*, não tem nosso trabalho outro mérito que o de procurar tornar mais prático aquilo que já se vinha realizando entre nós. Assim sendo, começamos a experimentar meios de cultura diferentes dos que eram empregados, modificando algumas vezes, a composição desses meios, e outras, apenas a técnica de preparação. Após uma série de pesquisas conseguimos resultados que consideramos plenamente satisfatórios.

MEIOS DE CULTURA

Entre os meios por nós preparados e modificados, dois revelaram condições ótimas para o desenvolvimento da *Endameba histolítica*.

Descreveremos em detalhes a técnica de preparação: tomam-se 1.000 cm³ de sangue de boi, estéril, em balão Erlenmeyer de 2.000

(1) Revista do Instituto Adolfo Lutz — V. II, n.º 1 — maio 1942.

cm³, deixa-se este sangue em repouso até a coagulação espontânea e completa, retirando-se por pipetagem ou sifonagem o sôro sobrenadante. Este, irá servir para a preparação do meio de cultura claro, que chamaremos "B"; o coágulo que ficou no balão, servirá para a preparação do outro meio, escuro, que designaremos por "A". O rendimento em coágulo para sangue de boi, pode ser estimado em cerca de 450 gramas.

PREPARAÇÃO DO MEIO ESCURO "A"

O balão contendo o coágulo, tendo o gargalo convenientemente protegido com tampão de algodão, é aquecido em banho-maria pelo espaço de 30 minutos; depois do aquecimento é o balão transferido para a geladeira à temperatura de 2-4° C.. E' conveniente repetir esta operação por duas vezes com intervalos de 24 horas.

Consegue-se assim, não só a esterilização do coágulo, como também a coagulação, pelo calor, dos protídeos nele existentes. E' então retirado o balão da geladeira e a êle juntados cerca de 400-500 cm³ de solução Locke estéril (pH 7,9 — 8,2).

Feita a mistura, o balão é levado à geladeira, onde permanecerá 6-10 dias, agitando-se-o suavemente duas vêzes por dia.

Reconhece-se que o meio está em condições de ser usado, quando o líquido sobrenadante apresentar-se com uma coloração vermelho-escura. Por decantação, distribue-se-o em tubos esterilizados, na quantidade de cerca de 4-5 cm³ para cada tubo. Êsses tubos assim preparados, devem ser guardados em geladeira até o momento da sementeira. Não esterilizar.

PREPARAÇÃO DO MEIO CLARO "B"

Sôro de sangue de boi ou de cavalo	350 cm ³
Solução de Locke	600 cm ³

Coloca-se o sôro em balão Erlenmeyer de 2.000 cm³, cuja abertura é protegida por um tampão de algodão. O balão é levado ao banho-maria até obter-se a coagulação do sôro. Uma vez obtida esta é ele imediatamente retirado do banho. Deixa-se resfriar e juntam-se aos poucos, 600 cm³ de solução de Locke estéril, abandonando-se a mistura ao repouso, à temperatura ambiente tendo-se o cuidado de agitá-la suavemente 2-3 vezes ao dia. O líquido sobre-

nadante (solução de Locke) tem, a princípio, um pH igual a 7,9 — 8,2. Em virtude da incorporação, por difusão, pela solução de Locke, dos princípios solúveis contidos no sôro coagulado, o pH desta solução tende a baixar progressivamente, atingindo, ao cabo de três a quatro dias, o valor de 7,6—7,2. (*)

Quando o pH atinge êsse valor, o líquido sobrenadante se apresenta com coloração amarela característica. E' de grande importância frisar que o pH é uma das condições essenciais para obtenção de um meio capaz de satisfazer às condições exigidas pela técnica. Por decantação, transvasa-se o líquido sobrenadante para balões estéreis, os quais deverão ser conservados em geladeira. No momento de sementeira distribue-se o líquido dêstes balões para tantos tubos de ensaio estéreis, quantos forem necessários, voltando a sobra dos balões à geladeira.

Êste meio claro B é preferível ao meio escuro A para as culturas iniciais e para repiques sucessivos, pois que parece ser um tanto impediante para o desenvolvimento de Blastocistis.

Meios semelhantes foram preparados, partindo-se de sôro de sangue humano. Os resultados obtidos com êles em provas culturais, foram concordantes com os alcançados com o sangue de boi. Presentemente, estamos experimentando a preparação de meios de cultura partindo de sangue de animais de outras espécies, tais como sôro de cavalo, coelho, carneiro, etc. e podemos adiantar que os resultados obtidos com êles são bons, sobretudo com o sôro de cavalo, de obtenção fácil e em boas condições de assepsia.

Esperamos poder, oportunamente, relatar estes resultados em nova publicação.

ESTERILIZAÇÃO

Aconselhamos não filtrar nem esterilizar pelo calor êste meio. A prática nos mostrou que o crescimento das *Endamebas* é tanto maior quanto menos sofrer o meio a ação do calor.

No momento de se fazer a sementeira dos cistos, distribue-se o meio do balão para os tubos de ensaio estéreis (16x16) na quantidade de 4 a 5 cm³ para cada tubo. Conforme já foi dito o balão contendo o meio deverá ser sempre conservado na geladeira.

(*) Êste valor é atingido naturalmente pela própria mistura.

Uma vez exposto o modo de preparação dos meios de cultura, passaremos a fazer algumas considerações sobre o processo para a obtenção das culturas da *Endameba histolítica*.

TÉCNICA

E' evidente que a obtenção de culturas de *Endameba histolítica* está condicionada à semeadura partindo de material contendo cistos desta espécie; entretanto, cuidados especiais devem ser tomados para esse desiderato.

Esses cuidados resumem-se nas duas condições seguintes: separação dos cistos das fézes e semeadura dos mesmos em meios apropriados.

MANEIRA DE PROCEDER

Reconhecida a existência dos cistos nas fézes examinadas, procede-se do seguinte modo: 5-10 gramas das fézes são colocadas em pequenos recipientes de vidro (copo Becker, cálice comum, frasco de Borrel), no qual se juntam alguns centímetros cúbicos de água. Agita-se a mistura com bastão de vidro e vai-se juntando água até que ela perca a consistência pastosa, tornando possível a centrifugação do líquido. Essa mistura fluida, de água e fézes, é então passada através de uma tela fina, para reter as partículas grosseiras. O líquido que passa, é recebido em copo de vidro, distribuído em tubos e centrifugado. Cuidados especiais devem ser tomados durante a centrifugação. Assim, a velocidade de centrifugação não deve ultrapassar a 2.000 r/m., durante cerca de 5 minutos e nunca além de 10. Separa-se o líquido sobrenadante por decantação, junta-se água, agita-se bem com um bastão de vidro o sedimento, atritando-o contra as paredes do tubo. Centrifuga-se de novo, repetindo-se essa operação de lavagem do sedimento tantas vezes quantas sejam necessárias para obter o líquido sobrenadante mais ou menos claro. A prática ensina-nos a conhecer o momento em que o sedimento está convenientemente lavado; nestas condições, temos um sedimento rico em cistos de mistura com outros detritos, porém razoavelmente lavados. Em geral, três lavagens são suficientes.

Segue-se então a suspensão dos cistos. O método por nós empregado é o de Faust, ligeiramente modificado. Ao sedimento que

ficou no tubo, junta-se pequena quantidade de solução de sulfato de zinco, de densidade 1.180 e, com um bastão de vidro, por agitação, procede-se à suspensão dos cistos procurando-se tornar a mistura bem homogênea. Novas quantidades de solução de sulfato de zinco são juntadas até completar o seu volume útil, agitando-se o tubo enérgicamente.

Esta operação deve ser realizada no mínimo espaço de tempo, porque o contacto demorado dos cistos com o sulfato de zinco pode determinar a morte dos mesmos, apesar da sua conhecida resistência. A seguir, centrifuga-se a suspensão dos cistos, em velocidade de 500 r/m., pelo espaço de 60-90 segundos.

É importante lembrar que a velocidade não deve ultrapassar 500 r/m., porquê poderia ocasionar a não flutuação dos cistos. Retira-se o tubo, cuidadosamente do centrifugador e, com uma pipeta aspira-se a camada superficial do líquido, rica em cistos que, graças à densidade da solução, vem à superfície juntamente com pequenas quantidades de outros detritos. A solução de sulfato de zinco que ficou no tubo, pode ser recuperada. (*)

O líquido aspirado é rapidamente transvasado em outro tubo. Junta-se então água destilada, agita-se para homogeneização e centrifuga-se por espaço de 5-6 minutos, com velocidade de 2.500 r/m.

Repete-se esta operação de lavagem tendo muito cuidado durante a decantação, para que os cistos não passem com a água. A lavagem dos cistos é terminada quando todo o sulfato de zinco tiver sido retirado por diluição. Em geral três lavagens são suficientes.

Assim isolado, o sedimento composto em sua maior parte por cistos, deve ainda sofrer o tratamento seguinte: ao tubo contendo sedimento, junta-se um pouco de solução normal de ácido

(*) A recuperação do sulfato de zinco, já usado no Processo de Faust, representa um fator econômico que deve ser levado em linha de conta. Depois de utilizada para a suspensão dos cistos de *Endameba histolítica* das fêzes a solução é armazenada em um recipiente a isso destinado. Quando o volume da solução de sulfato de zinco atingir uma quantidade razoável então procede-se à sua purificação. Esta consiste em filtração do líquido contendo detritos alimentares, cistos, ovos, etc., em papel de filtro comum. Depois de diversas filtrações, o líquido se apresenta mais ou menos claro. Ao filtrado junta-se 5-8 gramas de carvão ativo que ficará em contacto com ele cerca de 2-4 horas, agitando-se de vez em quando a mistura. Filtra-se o todo uma ou mais vezes até que o filtrado torne-se completamente claro e desodorado.

Toma-se a densidade do filtrado e corrige-se a falta de sulfato de zinco, juntando-se pequenas quantidades desse sal. Pode-se ainda, acertar a densidade da solução de sulfato de zinco, evaporando-se a água.

Este processo, apesar da sua simplicidade, permite a recuperação de quase 100% da solução de sulfato de zinco empregada.

clorídrico (36,5 em 1.000 de água), agita-se a mistura com bastão e deixa-se em repouso por alguns minutos (5-10). Decorrido este prazo, leva-se o tubo ao centrifugador (com velocidade de 2.000-2.500 r/m.) durante cerca de 5-6 minutos. Retira-se o ácido clorídrico por decantação e lava-se o sedimento com água destilada 3 a 4 vezes por centrifugação (2.000-2.500 r/m., cerca de 5-6 minutos).

E' de notar que se pode obter cultura de *Endameba histolítica* sem o tratamento do sedimento pelo ácido clorídrico. Mas, nesse caso, as culturas apresentam-se altamente contaminadas. E essa maneira de proceder é aconselhável para reduzir tanto quanto possível o desenvolvimento de microorganismos outros que não a *Endameba histolítica* e que acarretariam conseqüentemente uma redução no crescimento do parasita desejado.

Antes de semear é sempre conveniente o exame microscópico de uma pequena porção de sedimento, corado pelo lugol, afim de verificar se a morfologia dos cistos não foi alterada pelas operações sofridas.

SEMEADURA

O sedimento separado, por decantação, da última água de lavagem é tratado dor 1-2 cm³ do meio claro B, e semeado após ser bem misturado por aspirações sucessivas com pipeta.

Essa semeadura será feita em 2 ou 3 tubos contendo meio, tendo-se o cuidado de juntar a cada um desses tubos alguns miligramas de amido de arroz, previamente esterilizado e conservado em estufa a 37°C., para que se mantenha sempre sêco.

Levam-se os tubos à estufa, à temperatura de 37-38°C..

Ao cabo de 20-24 horas, o exame microscópico revela a presença de 2-5 amebas em forma vegetativa, por campo (ocular 3b, objetiva 40, E. Leitz Wetzlar).

Decorridas 48 horas, constata-se cerca de 15-20 amebas por campo microscópico.

A experiência tem demonstrado que se pode aumentar a capacidade de desenvolvimento da *Endameba histolítica*, enriquecendo-se o meio. Junta-se, para isso, a um ou dois tubos contendo meio claro B, além do amido de arroz, um pequeno fragmento de coágulo

do sangue de boi que foi previamente aquecido em banho-maria (100°C.) * (Fotografia n.º 1).

A princípio usávamos o coágulo sem ser tratado pelo calor, mas os resultados ficavam prejudicados pela presença de hemátias que, disseminadas no meio, atrapalhavam o crescimento das amebas, como também a sua boa observação. Nessas condições, obtêm-se culturas que apresentam, por campo microscópico, 40-50 amebas, como mostram as microfotografias 1, 2 e 3.

Vimos, anteriormente, que o pH do meio de cultura é um fator primordial para obtenção de resultados culturais satisfatórios. As nossas experiências mostraram que o pH não influe tão somente no desenvolvimento da *Endameba histolítica* mas, determina também, uma modificação no tamanho de cada forma vegetativa de per si. Assim, verificámos que, culturas realizadas em meio escuro A com pH 8,2 tiveram um crescimento satisfatório com relação ao número de amebas, apresentando-se porém, estas, sensivelmente diminuídas em tamanho. Amostras dessas mesmas culturas repicadas para novos tubos contendo o mesmo meio, porém com pH baixado para 8,0 cresceram de maneira satisfatória, com relação ao número de amebas por campo; mas o mesmo não aconteceu com referência ao tamanho dessas formas vegetativas, que, muito embora se apresentando maiores do que as anteriores, não tinham,

(*) Na preparação deste coágulo deve-se obedecer à técnica seguinte: recorta-se uma pequena porção de coágulo fresco, em pedacinhos, numa placa de Petri e leva-se ao banho-maria (100°C). Depois de aquecidos, os pedaços de coágulo são resfriados na geladeira e transferidos para tubos de ensaio estéreis 20x20, passando por esterilização ao vapor corrente durante 20-30 minutos após o que, serão conservados em geladeira.

No momento da semeadura dos cistos, junta-se ao meio claro B, um fragmento mínimo deste coágulo, juntamente com alguns miligramos de amido de arroz; este processo, conforme já o dissemos, serve para enriquecer os primeiros tubos de cultura, não devendo ser usado para os casos de repique.

Para enriquecer os repiques usaremos o soro de boi ou de cavalo (de preferência este último), segundo a técnica que iremos descrever: tomam-se 20-50 cm³ de soro de cavalo em balão estéril de 500 cm³, contendo pérolas de vidro. Coagula-se o soro em banho-maria; assim que o soro começar a coagular retira-se o balão do banho e com um bastão procura-se fragmentar o soro, agitando-se-o enérgicamente para facilitar a maior fragmentação do soro pelas pérolas. Deixa-se resfriar o todo e junta-se 100-150 cm³ de solução fisiológica. Agita-se diversas vezes e deixa-se repousar a mistura. Decanta-se o soluto fisiológico, repetindo-se 4-5 vezes a mesma operação, afim de se obter completa lavagem dos fragmentos do soro coagulado. Depois da última lavagem, junta-se ao sedimento mais ou menos o dobro do volume de solução fisiológica e esteriliza-se a suspensão por tinalização, levando, depois, à geladeira.

No momento de se fazer o repique de Endamebas, junta-se pequeníssima porção destes fragmentos do soro ao meio claro B, juntamente com alguns miligramos de amido de arroz. Desta maneira obtém-se um extraordinário crescimento de amebas, nos repiques sucessivos, graças à adição do soro lavado.

contudo, atingido as dimensões normais. Com o abaixamento do pH para 7,8 verifica-se que o desenvolvimento obtido dá-se de maneira satisfatória, atingindo seu tamanho quase normal. Com pH igual a 7,6-7,2 em meio claro B, obtém-se finalmente, formas vegetativas exuberantes em qualidade e quantidade. O exame microscópico revela então, não só a riqueza por campo, como também, permite observar que as formas vegetativas apresentam-se em suas dimensões normais, como se se fizesse cultura partindo de um meio de pH 7,6-7,2.

Faz-se a verificação das amebas semeadas, colhendo-se amostras que são colocadas entre lâmina e lamínula e examinadas ao microscópio.

Nos exames microscópicos para verificação e contagem das amebas por campo, cuidados especiais devem ser tomados para obtenção de resultados concordantes, principalmente no que diz respeito à tomada da amostra. Descrevemos em detalhes êsse particular. O tubo contendo a cultura é retirado da estufa, cuidadosamente, e mantido em posição inclinada. Com uma pipeta estirada, munida de pera de borracha, retira-se da porção junto aos grãos de amido, uma quantidade de sedimento suficiente para a preparação de uma lâmina. Insistimos na necessidade de se seguir rigorosamente essa técnica porquê a prática tem demonstrado que é junto aos grãos de amido depositados no fundo do tubo, que as amebas se apresentam em maior número.

Aconselhamos também o exame periódico após 24 e 48 horas, porquê, em alguns casos, a passagem dos cistos para as formas vegetativas, dá-se ao cabo dêsse tempo; casos há em que, decorridas 48 horas, não se encontram ainda no tubo de cultura amebas em formas vegetativas. Êsse fato não quer dizer que o desenvolvimento não venha a dar-se, mas mostra que há apenas um retardamento na transformação dos cistos, podendo-se atribuir isso a um êrro de técnica ou qualquer outro fator ainda desconhecido.

Nossa experiência e observação conduz-nos a admitir que o tempo de desenvolvimento dos cistos em formas vegetativas é dependente do número de núcleos existentes nos cistos. Assim, se semearmos cistos ou formas pré-císticas predominantemente mononucleadas, as culturas desenvolvem-se em geral no espaço de 18-24 horas; se partirmos de amostras cujos cistos predominantes sejam binucleados, veremos que o crescimento se dá depois de 24 horas.

De um modo geral, podemos, pois, adiantar que, quanto maior for o número de núcleos existentes nos cistos, mais vagarosa é a passagem da forma de resistência à forma vegetativa e daí o maior tempo para se obter culturas ricas partindo-se de material contendo, predominantemente, cistos com quatro núcleos.

O material que serviu para o exame em lâmina, poderá servir de elemento de repique, uma vez que seja rico em formas vegetativas. Para isso basta que, por meio de uma pinça, retire-se a lâminula, fazendo-se escorrer sôbre ela cêrca de 0,5 cm³ do meio claro B, deixando-se cair o líquido de lavagem sôbre a outra parte do material que ficou na lâmina. O todo é então levado a um outro tubo de meio de cultura ao qual se juntam alguns miligramos de amido de arroz. Ao cabo de 48 horas temos outro tubo de cultura.

REPIQUE DA CULTURA DE ENDAMEBA HISTOLÍTICA

Quando procurámos realizar culturas de *Endameba histolítica*, tínhamos em mira a obtenção de meios ricos dêsses parasitas, visando o emprêgo prático das suas múltiplas aplicações.

As culturas pelos métodos usuais são geralmente pobres de amebas (12-20 amebas por campo), porisso que, ao seu lado, há uma enorme proliferação de bactérias que muito lhe prejudicam o crescimento. E, sabe-se que, como único meio de purificação dessas culturas, usam-se apenas os repiques sucessivos. E' nos repiques, entretanto, que residem as maiores possibilidades de êxito nas culturas de *Endameba histolítica* e porisso chamamos a atenção para os detalhes que exporemos a seguir.

Acontece que, nem sempre a primeira sementeira de cistos de *Endameba histolítica*, isolados diretamente das fêzes, atinge o desenvolvimento desejado. Desenvolvimento apreciável, porém, poderemos obter nas sub-culturas, se seguirmos a técnica abaixo indicada.

A cultura obtida como anteriormente descrevemos deve ser examinada cada 48 horas. O primeiro repique será feito sempre depois de 48 horas.

Um outro fato que se deve levar em consideração na obtenção de bons repiques de ameba é o referente à presença de Blastocistis, cuja maior capacidade reprodutiva, como já o demonstraram vários pesquisadores, inibe o desenvolvimento daquele protozoário. As-

sim, se durante os primeiros repiques, os Blastocistis estiverem comprometendo o bom desenvolvimento das amebas, a cultura deverá ser forçosamente despresada.

As vezes acontece de se ter poucos Blastocistis na cultura, podendo êles desaparecer com os repiques sucessivos; daí a vantagem de se tentar um ou dois repiques para ver si os Blastocistis continuam ou não a sua proliferação.

Uma vez conseguida uma cultura livre ou quasi livre de Blastocistis, estamos em condições de praticar o primeiro repique. Dois são os caminhos a seguir para êste repique:

1.º — Fazê-lo depois de 48 horas, utilizando-se para isso do sedimento do tubo de cultura, que será transferido para novos tubos contendo meio claro B e ao qual se juntou alguns miligramos de amido de arroz.

2.º — Fazê-lo lavando-se primeiro o sedimento em sôro fisiológico, para depois então transferi-lo a novos tubos de cultura com meio claro B, aos quais se juntam alguns miligramos de amido de arroz e, também, uma parcela mínima da suspensão do sôro coagulado de cavalo, de cuja preparação falámos.

O sedimento de cada tubo de cultura pode ser repicado para 5 outros tubos novos.

A técnica dêste segundo processo é a seguinte: depois de 48 horas retira-se do fundo dos tubos das culturas iniciais, por meio de pipeta, todo o sedimento que será transferido para tubos de centrífuga. Ao sedimento juntamos solução fisiológica até completar o volume útil do tubo. Por meio da mesma pipeta, mistura-se solução fisiológica e sedimento, o que se poderá também fazer com pequeno bastão de vidro. Centrifuga-se com velocidade de 500-600 r/m. durante 3-4 minutos. Esta operação deve ser feita mais ou menos rapidamente e somente uma única vez. Ao sedimento rico em amebas, junta-se então pequena porção do meio claro B; depois de bem homogeneizado o material, é êle distribuído em tubos de cultura, contendo sempre o meio claro B, juntamente com alguns miligramos de amido de arroz e 1-2 gotas da suspensão de soro de cavalo em solução fisiológica. Os tubos são levados à estufa a 37°-38°C..

Depois de 48 horas processa-se novo repique, tendo-se o cuidado de não lavar mais o sedimento em solução fisiológica.

O número de amebas vai então aumentando gradativamente de um repique para outro. Notável é, porém, o desenvolvimento

das amebas do segundo até o quinto repique. Quando, portanto, se pretender grande quantidade de *Endameba histolítica* em cultura, deve-se fazer o segundo, terceiro e quarto repiques, não para poucos tubos de cultura, mas para muitos, utilizando-se sempre o meio claro B, com alguns miligramas de amido de arroz e quando necessário, 1-2 gotas da suspensão de sôro de cavalo para o enriquecimento dos repiques.

Procedendo dessa forma obtivemos culturas cujos campos microscópicos revelaram a existência até de 140 unidades (ocular 3b, objetiva 40, idem).

Durante nossos estudos em culturas que apresentavam 30-40 elementos por campo, o Dr. Marcelo O. Álvares Corrêa, competente e laborioso biólogo deste Instituto, logrou contar cêrca de 1.500.000 amebas em média, por centímetro cúbico de cultura. Esta cifra ultrapassa de muito os resultados até então obtidos nos outros laboratórios que estudam o assunto.

Daí para cá, temos conseguido ainda culturas muito mais ricas cujas contagens, porém, não fizemos.

O fato de se conseguir culturas ricas e em relativa pureza, graças à técnica de repique acima descrita, permitiu-nos a obtenção de *Endameba histolítica* em estado sêco.

SECAGEM DA ENDAMEBA HISTOLÍTICA; PREPARAÇÃO DO ANTIGENO

Depois de lavado duas vezes com água destilada (por centrifugação) o sedimento da cultura é espalhado nas paredes do tubo e pôsto no secador a vácuo. 30-40 horas, em geral, são suficientes para a secagem. Depois de sêco é o sedimento triturado e conservado em tubo fechado a lâmpada.

Nessas condições temos a Ameba histolítica sob a forma de um pó branco-amarelado, contendo alguns detritos microbianos ao lado de fragmentos de grãos de amido. (Fotografia n.º 2.)

E' óbvio que, quando se pretende reduzir as culturas a pó, deve-se colocar nos tubos do último repique apenas o mínimo possível de amido de arroz, devendo-se ter o cuidado de não colocar fragmentos de sôro lavado.

Dessa forma, obtém-se um pó com o máximo de pureza em amebas.

A partir dêsse pó conseguimos antígeno alcoólico incolor e inodoro que, experimentado nas reações de fixação do complemento para amebiase, deu ótimos resultados.

Continuamos estudando a atividade do antígeno em função do pêso da substância sêca, por unidade de volume de álcool absoluto empregado, e do maior ou menor tempo para a sua preparação.

O método habitual de obtenção do antígeno para as reações de fixação de complemento é o descrito por Craig, que se resume no seguinte: lava-se uma vez em soluto fisiológico e por centrifugação a 2.500-3.000 r/m. durante 8-10 minutos o sedimento contendo amebas. Junta-se depois, a êsse sedimento, álcool absoluto na proporção de 1 de sedimento para 7,5 volumes, de álcool absoluto, conforme preconiza Craig. Coloca-se o todo em frasco estéril contendo pérolas de vidro para facilitar a fragmentação dos trofozoitos.

Êste extrato alcoólico de amebas deverá permanecer quinze dias na estufa a 37°C., tendo-se o cuidado de agitá-lo 2-3 vezes por dia. Filtra-se em papel de filtro, obtendo-se finalmente o antígeno.

CONCLUSÕES

Pelo exposto é lícito concluir:

1.º — que é possível a obtenção de cultura de Endameba histolítica em meio preparado a partir dos soros de boi, cavalo, carneiro ou de coelho;

2.º — que a adição a êsses meios, de uma pequena parcela de coágulo de sangue de boi, previamente aquecido, enriquece grandemente as primo-culturas, o mesmo acontecendo com os repiques, quando ao meio se adiciona fragmentos de sôro coagulado de cavalo, suspensos em sôro fisiológico;

3.º — que os meios de cultura por nós preparados e alguns apenas modificados, prestam-se não só às culturas iniciais de Endameba histolítica, partindo de cistos isolados de fezes, como também ao repique das formas vegetativas já desenvolvidas;

4.º — que pelos repiques sucessivos obtêm-se culturas de Endameba histolítica razoavelmente puras e com um número tal de unidades vegetativas que poderá atingir numa gota de material, a cifra de 140 por campo microscópico (obj. 40, oc. 3b);

5.º — que dada a sua facilidade, este método cultural apresenta-se vantajoso sempre que houver dúvidas referentes à identificação direta dos cistos de ámebas;

6.º — que é possível obter-se de culturas ricas, a *Endameba histolítica* em estado sêco;

7.º — que este pó de *Endameba histolítica* presta-se à preparação de um antígeno para reações de fixação do complemento, mais puro e ativo e sem o cheiro repugnante característico das preparações semelhantes até então conhecidas.

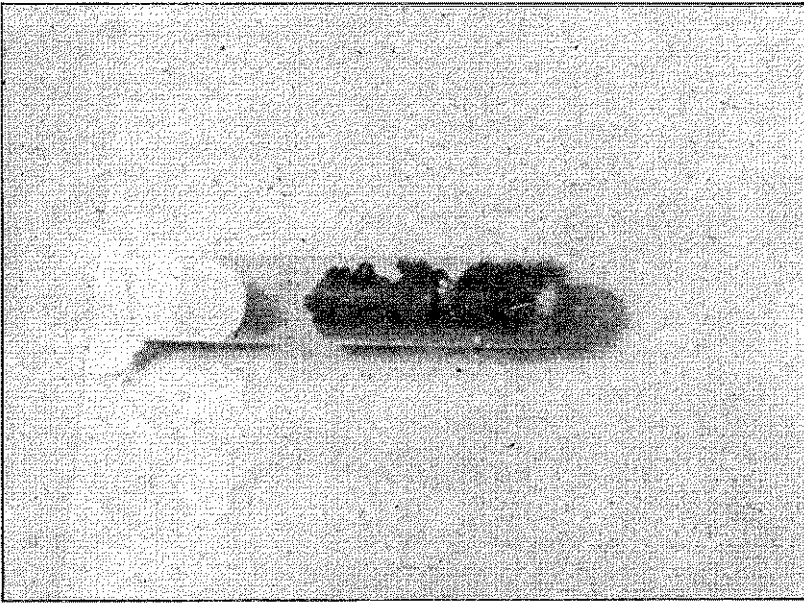
AGRADECIMENTOS

Nosso trabalho não tem outro mérito além daquele a que possa porventura aspirar um técnico de laboratório, habituado à prática cotidiana da protozoologia intestinal humana. Assim, se êle lograr ser objeto de algum interesse, embora mínimo, por parte dos cientistas, dar-nos-emos por muito bem pago de todo o esforço dispendido na sua elaboração.

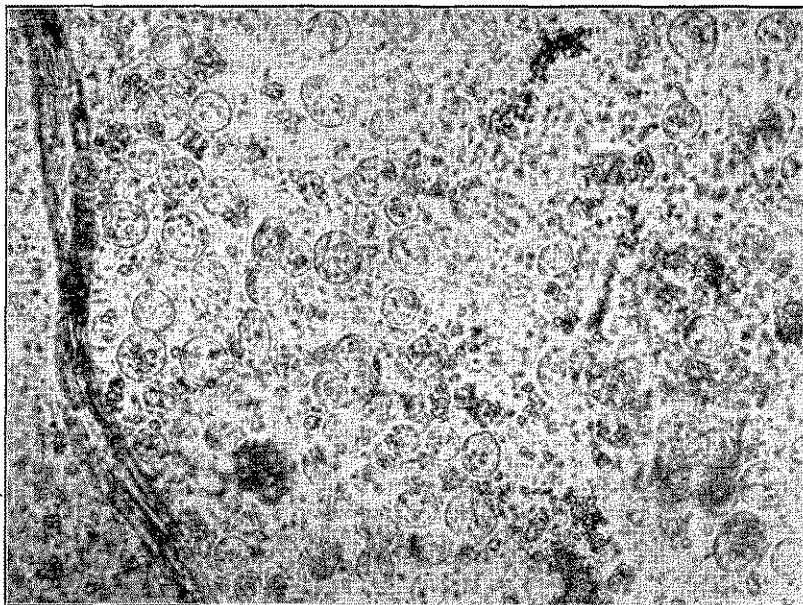
Exercendo nossa atividade num ambiente científico onde a curiosidade, por mais modesta que seja, encontra sempre carinhoso agasalho, conseguimos realizá-lo e hoje publicá-lo.

Esse desiderato, porém, não seria certamente conseguido, se não contássemos, nos momentos de incertezas e de dúvidas, com as luzes e a infinita bondade de alguns mestres do Instituto e, também com a boa vontade e o desinteressado auxílio de alguns colegas de trabalho.

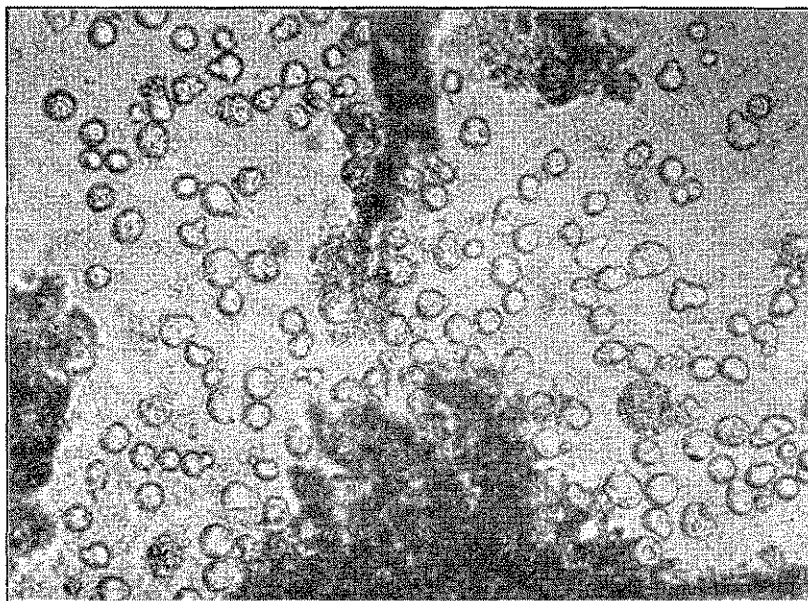
Deixamos, pois, aqui consignada tôda a nossa imperecível gratidão aos ilustres Drs. Bruno Rangel Pestana, Luiz de Sales Gomes, Augusto de E. Taunay, Marcelo O. Alvares Corrêa, ao Sr. Ettore Rugai e também, aos presados colegas Srs. Gabriel Garcia de Figueiredo, Antônio Amorosino, Alexandre Malvéstio, Adrião Neves de Moraes, Neli Braga de Macedo e Vail Natali.



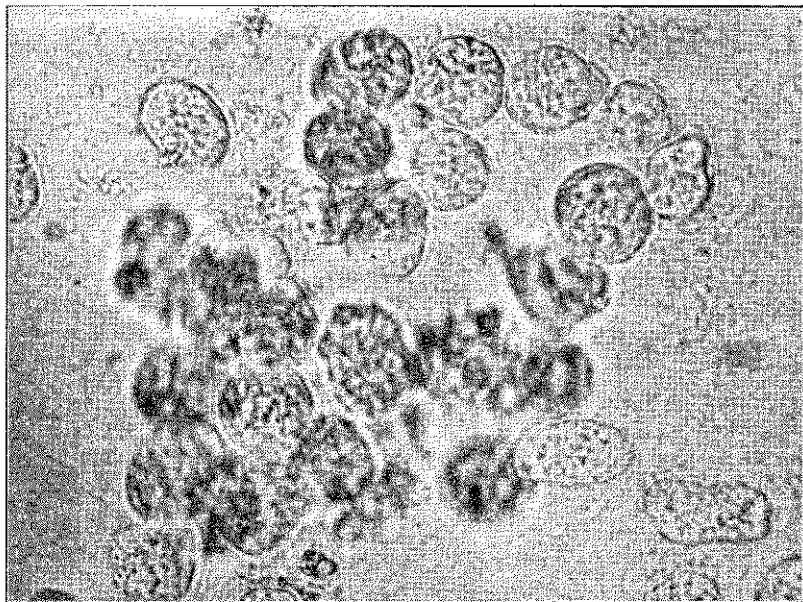
FOTOGRAFIA N.º 1



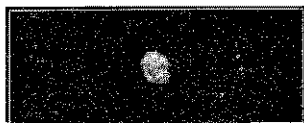
MICROFOTOGRAFIA N.º 1



MICROFOTOGRAFIA N.º 2



MICROFOTOGRAFIA N.º 3



FOTOGRAFIA N.º 2