

EDITORIAL

LABORATÓRIO DE PROTOZOOLOGIA INTESTINAL

Estão voltando em evidência, e por causa da AIDS, os novos protozoários intestinais encontrados associados a esta síndrome em humanos⁷. Esta tem sido sempre a parte mais difícil da protozoologia e, por esta razão, mal feita, na maioria das rotinas de laboratório de parasitologia. Alguns cistos são encontrados numa sedimentação de amostra de fezes ressequidas, e devidamente relatados. Frequentemente, não há sequer um micrômetro ocular adequado, tão essencial para a diferenciação das espécies de *Entamoeba*. A resistência à invasão da mucosa pela *Entamoeba histolytica* no homem não parece depender de imunidade mediada por células; conseqüentemente, pacientes com AIDS não são predispostos à amebíase invasiva.

Com pequeno esforço, pode-se obter material fresco, desde que, com luvas, uma partícula de fezes frescas pode ser facilmente extraída do reto, até mesmo de uma criança. Para pacientes com diarreia, a situação ideal é ter um microscópio à mão (de preferência com uma platina aquecida), durante a sigmoidoscopia, e transferir os raspados diretamente para lâminas, a fim de se procurar trofozoítas de *E. histolytica* móveis, em úlceras intestinais. Com um microscópio de boa resolução, pode-se ver, não apenas a diferenciação entre nítidos ectoplasma e endoplasma granular, mas também o movimento brusco não dirigido, e mesmo os detalhes da estrutura nuclear e eritrócitos intracitoplasmáticos. Frequentemente, *E. histolytica* vivas invasivas são grandes (20-50 μ).

Na falta desses recursos para se ver trofozoítas vivos, dá-se preferência à cultura. Se as fezes forem coletadas à noite ou de manhã cedo, são colocadas numa estufa a 37°C. De manhã, a primeira tarefa no laboratório é semear duas culturas que são mantidas a 37°C durante 48 horas. Estas são analisadas para trofozoítas em intervalos diários. Muitos são vistos, inclusive *Dientamoeba fragilis*. Na verdade, sem a cultura, o laboratório perde esse agente patogênico suspeito. Muitos meios de cultura têm sido usados, essencialmente tubos de agar inclinados, enriquecidos com cobertura de proteína e amido basal⁶. O meio de Robinson se apresenta com bom sucesso⁸, mas muitos trofozoítas de *E. histolytica*, *E. hartmani*, e *E. polecki* crescem com dificuldade³. Trofozoítas vivos podem estar também em estrias de muco sangüinolento de fezes frescas, tamponadas com

THE INTESTINAL PROTOZOLOGY LABORATORY

It is coming back into fashion and it is because of AIDS and the new intestinal protozoa found associated with this syndrome in man⁷. It has always been the most difficult part of protozoology and for this reason badly done in most routine parasitology laboratories. A few cysts are found in a sedimentation of an stool specimen and duly reported. Often there is not even an eyepiece micrometer in place so essential for differentiating *Entamoeba* species. Resistance to *Entamoeba histolytica* mucosal invasion in man does not appear to depend on cell mediated immunity hence AIDS patients are not prone to invasive amoebiasis.

Little attempt is made to obtain fresh material although with a gloved finger a pellet of fresh stool can often be extracted from the rectum of even a child. For diarrhoeal patients the ideal situation is to have the microscope (preferably with a warm stage) mounted alongside the sigmoidoscope and transfer fresh scrapings directly to slides to look for motile *E. histolytica* trophozoites from bowel ulcers. With a good resolution microscope not only the differentiation between clear ectoplasm and granula endoplasm can be seen and the unidirectional thrusting movement but even details of nuclear structure and intracytoplasmic erythrocytes may be discerned. Often live invasive *E. histolytica* are large (20-50 μ).

Failing such facilities to see live trophozoites culture is preferred. Stools, if collected overnight or in the early morning, are put in a 37°C incubator. The first laboratory task in the morning is to seed two cultures which are maintained for 48 hours at 37°C. These are examined at daily intervals for trophozoites. Many are seen including *Dientamoeba fragilis*. Indeed without culture the laboratory misses this suspected pathogen. Many culture media have been used; essentially enriched agar slants with a protein overlay and basal starch⁶. Robinson's medium is attended by good success⁸ but many trophozoites of *E. histolytica*, *E. hartmani*, and *E. polecki* remain difficult to grow³. Live trophozoites can also be in a blood mucus fleck from a fresh formed stool mixed with buffered normal saline. Laboratory saline is acid (pH

solução salina normal. A solução salina de laboratório se torna ácida (pH 6) pelo anidrido carbônico do ar em 24 horas e mata os trofozoítas. Os trofozoítas devem ser corados para lâminas permanentes. Fixador de Shaudinn e coloração pela hematoxilina férrica de Heidenhain proporcionam a melhor diferenciação nuclear. A cromatina periférica regular e o cariossoma central do núcleo da *E. histolytica* contrastam com os dos outros protozoários intestinais não patogênicos. Corante tricromo tende a desbotar com o tempo, mesmo com conservante.

Existem muitas técnicas de concentração disponíveis para se evidenciar cistos, mas a sedimentação simples é a mais amplamente empregada no Brasil. Embora seja satisfatória com relação a ovos de helmintos, não é muito sensível para cistos de protozoários, especialmente se escassos, porque todos os detritos nas fezes se sedimentam da mesma forma. A concentração pelo formol-éter propociona uma concentração de cistos de protozoários, vinte vezes maior, embora todos os trofozoítas sejam destruídos. O autor prefere uma modificação da técnica original de Ritchie¹. Uma gota de solução iodada de Lugols, adicionada a uma gota de concentrado, facilita o diagnóstico. Uma população de cistos deve ser analisada e medida com o micrômetro ocular, pois, freqüentemente, várias cepas estão presentes. Geralmente, grandes quantidades de *Giardia lamblia* estão presentes, embora este parasito possa causar esteatorréia e não ser perceptível numa amostra de fezes. Aqui, o teste com cordão de Beales é útil².

Embora a concentração de formol-éter geralmente detecte oocistos de *Isospora belli*, do grupo coccídeo, uma técnica de flutuação, por centrifugação, de uma solução concentrada de açúcar e sulfato de zinco, e exame da lamínula sobrenadante, é mais sensível. Oocistos de *Isospora* e esporocistos de criptosporidiose são detectados. *Enterocytozoon bienersi*, um parasito microsporídico, foi reconhecido recentemente, também, como uma outra causa de diarreia em AIDS. Ele produz um esporo de apenas um micron de diâmetro e, geralmente, até ao momento, tem sido diagnosticado pela biópsia de intestino^{4,5}. Contudo, um trabalho recente confirma a identificação de esporo em fezes, e um novo método desenvolvido de detecção que não use concentração⁹.

É evidente que um laboratório separado para protozoologia intestinal é uma aquisição vantajosa para a pesquisa atual sobre doenças infecciosas. Como estive envolvido na instalação de vários desses laboratórios, ofereço algumas sugestões práticas:

6) from air carbon dioxide in 24 hours and kills trophozoites. Trophozoites should be stained for permanent mounts. Schaudinn's fixative and Heidenhain's iron haematoxylin stain gives the best nuclear differentiation. The regular peripheral chromatin and central karyosome of the *E. histolytica* nucleus contrast with these or the other non pathogenic intestinal protozoa. Trichrome stain tends to fade with time even under permanent.

For cyst detection many concentration techniques are available but simple sedimentation is the most widely used in Brazil. While satisfactory for helminth eggs it is not very sensitive for protozoal cysts especially if scanty because all detritus in the stool sediments as well. Formol ether concentration gives a twenty fold protozoal cyst concentration although all trophozoites are destroyed. The author prefers a modification of the original Ritchie technique¹. A drop of Lugol's iodine added to a drop of concentrate facilitates morphological diagnosis. A population of cysts should be examined and measured with the eye piece micrometer as often several species are present. *Giardia lamblia* may be present in large numbers although this parasite can cause steatorrhea and not be detectable in a stool specimen. Beales string test is useful here².

Although formol ether concentration usually detects *Isospora belli* oocysts for the coccidial group a flotation technique centrifuging onto a coverslip from a concentrated sugar or zinc sulphate solution is more sensitive. Both *Isospora* oocysts and cryptosporidiosis sporocysts are detected. *Enterocytozoon bienersi* a microsporidial parasite has recently been recognised as yet another cause of diarrhoea in AIDS. It produces a spore of only one micron diameter. It has usually been diagnosed by Bowel biopsy to date^{4,5}. A recent report however confirms stool spore identification and a new detection method developed which does not use concentration⁹.

It is clear that a separate intestinal protozoology laboratory is a useful addition to current infectious disease investigation. As a worker who has been involved in establishing several such laboratories a few practical tips are offered:

1. o laboratório deve ser trancado quando não estiver em uso, e o microscópio manuseado somente por pessoas treinadas para a sua manutenção;
2. fazer sempre uma descrição microscópica completa da amostra de fezes recebida, com referência a cor, consistência, presença de sangue, de muco e de outras anormalidades, tais como: bário, corpos estranhos, parasitos visíveis (proglótides, nematóides ou larvas dípteras);
3. treinar os internos para se apressarem em lavar as fezes para o laboratório, o mais cedo possível. O pessoal deve começar a trabalhar cedo!
4. usar um microscópio adequado, lâminas e lamínulas limpas para análise em imersão no óleo;
5. manter sempre no lugar o micrômetro ocular;
6. examinar e medir a população de parasitos, visto que infecções mistas são comuns;
7. estabelecer técnicas eficazes de culturas para protozoários intestinais;
8. usar técnicas de concentração sensíveis e confiáveis;
9. fazer preparados permanentes de lâminas positivas ilustrativas, uma vez por semana, por técnico adequadamente treinado em obter boa coloração.

No futuro, muito se esclarecerá com relação a outros protozoários intestinais e AIDS. *Balantidium coli*, que pode geralmente ser cultivado com facilidade, certamente será relatado como um agente patogênico associado à AIDS. Resta ser definido o papel de *Dientamoeba fragilis*, *Trichomonas hominis*, *Blastocystis* e *Sarcocystis* em pacientes com imunodeficiência. Um dos problemas no preenchimento dos postulados de Koch é que, freqüentemente, não há modelos animais, exceto, possivelmente, os macacos mais diferenciados, atualmente proibidos.

Um último aspecto importante da protozoologia intestinal se refere à intermitência da excreção do parasito, que nunca foi pesquisada de modo satisfatório. Até os melhores laboratórios recomendam a análise de três amostras de fezes⁶. Obviamente, em parte, isto se refere à dieta e duração do trânsito. Este último pode ser demorado em pacientes numa área endêmica de doença de Chagas, devido aos danos ocorridos nos gânglios parassimpáticos do músculo liso do intestino. Talvez esta situação seja uma justificativa para o uso de um purgante salino para se encontrar protozoários intestinais.

1. the laboratory should be locked when not in use and the microscope only used by people trained in its maintenance;
2. always provide a full macroscopic description of the stool specimen received as regards colour, consistency, presence of blood and mucus and other abnormalities (eg. Barium, foreign bodies, visible parasites (proglottids, nematodes or dipteran larvae);
3. train interns to rush fresh stool to the laboratory holding incubator as early as possible. Staff must start work early!
4. use an optimal microscope and thin clean slides and coverslips that permit oil examination;
5. have the eye piece micrometer always in place;
6. examine and measure a population of parasites as mixed infections are common;
7. establish effective culture techniques for intestinal protozoa;
8. use reliable sensitive concentration techniques;
9. make permanent mounts of significant positive slides once a week with a suitable trained technician for the difficult staining.

Much will become apparent regarding other intestinal protozoa and AIDS in the future. *Balantidium coli* which can usually be cultivated with ease will certainly be reported as a pathogen associated with AIDS. The role of *Dientamoeba fragilis*, *Trichomonas hominis*, *Blastocystis* and *Sarcocystis* in immunosuppressed patients remains to be defined. One of the problems in fulfilling Kochs postulates is that there are frequently no animal models, apart possibly from the high apes which are prohibited today.

A final important aspect of intestinal protozoology relates to the intermittency of parasite excretion which has never been satisfactorily investigated. Even the best laboratories recommend the examination of three stool specimens⁶. Obviously in part this relates to diet and transit time. The latter may be slowed in many patients in a Chagas endemic area due to damage to the parasympathetic ganglia in the gut smooth muscle. Perhaps this situation is a justification for the use of a saline purge to find intestinal protozoa.

REFERENCES

1. Alen AVH, Ridley DS. Further observations on the formol ether technique for faecal parasites. *Journal of Clinical Pathology* 23: 545-546, 1970.
2. Beal CB, Viens P, Grant RGL, Hughes JM. A new technique for sampling jejunal contents. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 19: 349-352, 1970.
3. Botero D. Rate of growth of *Entamoeba histolytica* indifferent culture media. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 55: 539-546, 1961.
4. Bryan RT, Cali A, Owen RL, Spencer HC. Microsporidia Opportunistic Pathogens in Patients with AIDS. *In: Progress in Clinical Parasitology Vol 2*. Ed. Sun T. Field e Wood. New York p. 1-20, 1991.
5. Eeftink Schattenkerk JKM, Van Gool T, Van Ketel RJ, Bartelsman JFWM, Kuiken CL, Terpstra WJ, Reiss P. Clinical significance of small intestinal microsporidiosis in HIV-I-infected individuals. *The Lancet* 337: 395-398, 1991.
6. Melvin DM, Brooke MM. *Laboratory Procedure for the Diagnosis of Intestinal Parasites*. 3rd Ed. 233p. HHS Publication No (CDC) 82-8282, 1982.
7. Quinn TJ. Protozoan Infections. p. 66-68. *In: Smith PD. Moderator Gastrointestinal Infections in AIDS. Annals of Internal Medicine* 116: 63-77. 1992.
8. Robinson GL. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 62: 285-294, 1968.
9. Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox CM, Gorelkin L, Visversara GS. Improved light microscopy detection of microsporidial spores in stool and duodenal aspirates. *New England Journal of Medicine* 526: 161-165, 1992.

Philip D. Marsden
Núcleo de Medicina Tropical e Nutrição
Universidade de Brasília, DF