

MÉTODO DE FAUST ET AL.: RENDIMENTO DE COLHEITA POR ALÇA METÁLICA (1)

Dante da Silva PEREIRA (2) & Cláudio Santos FERREIRA (3)

RESUMO

A eficiência do uso de uma alça metálica para a remoção de elementos parasitários flutuantes foi investigada. A quantidade de elementos removidos a cada alçada sucessiva foi confrontada com um modelo logarítmico, o qual indicou que cada alçada retirou cerca de 30% dos elementos parasitários flutuantes remanescentes. Estimou-se que as 5 primeiras alçadas retiraram um total de 83% dos elementos parasitários flutuantes, sendo este um procedimento adequado para o método sob investigação.

UNITERMOS: Parasitologia; Faust; Coproscopia; Contagem.

INTRODUÇÃO

Dentre processos de uso freqüente em Laboratório de Parasitologia Clínica, encontra-se o "método de FAUST et al."^{4, 5, 6}, destinado à pesquisa de cistos de protozoários e ovos pouco densos e larvas de helmintos^{9, 12}. A designação "método de FAUST et al." tem sido aplicada a uma série de diferentes processos descritos pelos autores da publicação original e por outros que nela introduziram modificações^{1, 2, 7, 15, 16, 17, 18}.

Originalmente, FAUST et al., prescreveram, em 1938, dentre outros métodos, o de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco, sendo a colheita do material flutuante feita por meio de lamínula superposta à boca do tubo-de-ensaio contendo a suspensão centrifugada⁹. Trata-se de modificação de método descrito em 1923, por LANE^{9, 10, 13}. Em estudo comparativo de 1939, FAUST et al.¹⁰, apresentaram, sob a denominação "técnica 8", a centrifugo-flutuação em sulfato de zinco com colheita do material flutuante feita por meio de alça bacteriológica, procedimento e método que foram, a partir de então, recomendados. A utilização da alça para este fim havia sido proposta inicialmente por KOFOID & BARBER¹⁰.

Permitindo grande eficiência na concentração de elementos parasitários¹⁰, o "método de FAUST et al." foi objeto de vários estudos de comparação de eficácia ou rendimento com outros processos já consagrados^{4, 6, 12, 18}. Estabelecendo-se correspondências dos diferentes conjuntos de prescrições do método, citados nestes estudos e em compêndios de Parasitologia, com a "técnica 8", constata-se haver, em geral, prescrições conflitantes^{1, 11, 15, 16}, observando-se modi-

ficações conflitantes^{1, 11, 15, 16}, observando-se modi-

(1) Parte da Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em Junho de 1984. São Paulo, SP, Brasil.

(2) Fundação Universidade Estadual de Londrina. Londrina, PR, Brasil.

(3) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.

Endereço para correspondência: Dr. Cláudio Santos Ferreira — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Caixa Postal 4365. 01051 São Paulo, SP, Brasil.

ficações de praticamente todas as operações da "técnica 8".

Dentre operações decisivas para o rendimento do método está a colheita do material fluante por meio de alça. O número de alçadas a serem retiradas é um dos seus aspectos principais; entretanto, há divergências entre os autores sobre o assunto: FAUST et al. recomendam a retirada de 3 alçadas, SACRAMENTO refere-se a 2 ou 3, TOBIE a 3 ou 4 e RIBEIRO, a dez^{10, 17, 18, 19}. Opiniões tão diversas levaram-nos a pesquisar sua fundamentação.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

— Amostras de fezes humanas de consistência normal¹¹, contendo cistos de *Entamoeba coli* (GRASSI, 1879) CASAGRANDE & BARBAGALLO, 1895, ou de *Giardia lamblia* STILES, 1915, mantidas à temperatura de 4°C por 5 dias, no máximo.

— Microscópio binocular "Nikon" modelo "SBR" equipado com objetivas acromáticas "Nikon 10/0,25 160/-e 40/0,65 160/0,17" e oculares "HKW 10X 18,0".

— Centrifugador "International" modelo "K" equipado com tacômetro.

— Balança "Marte" modelo "1001", com precisão de 0,1 g.

— Alça circular com diâmetro externo de 4,5 mm feita com fio de níquel-cromo "24 AWG" (0,64 mm de diâmetro).

— Areômetro com escala compreendida entre 1000 e 1500 kg/m³ e precisão de 5 kg/m³.

— Solução de sulfato de zinco com massa específica 1180 kg/m³, constituído de ZnSO₄·12H₂O "Qeel" "para análise" dissolvido em água destilada.

— Solução de Lugol.

— Tubos-de-ensaio de 10 x 75 mm.

— Lâminas para microscopia de 26 x 76 mm, com espessura de 1,2 mm.

— Lamínulas de 20 x 20 mm, com espessura de 0,17 mm.

— Tamis metálico com 18 malhas por centímetro.

— Película "parafilm M".

— Vidraria comumente utilizada em Laboratório Clínico.

Método

Prescrições adotadas para execução do método de FAUST et al.

1 — Cada recipiente contendo amostra fecal foi pesado, antes e após a transferência (com auxílio de um bastão de vidro) de parcela da mesma para um frasco de Borrel. Considerou-se a diferença entre os resultados das pesagens como o peso da parcela transferida.

2 — Cada amostra foi diluída em água destilada com volume suficiente para formar uma suspensão a 10% (p/v). A massa específica das fezes foi considerada como 1000 kg/m³⁽³⁾.

3 — A massa fecal foi cuidadosamente desagregada em água por meio de bastão de vidro.

4 — A suspensão foi passada através de tamis para cálice de sedimentação.

5 — O líquido tamisado foi homogeneizado por agitação, usando-se o bastão de vidro.

6 — Imediatamente após a operação de homogeneização, uma parcela da suspensão foi transferida para um tubo-de-ensaio de 10 x 75 mm, sendo preenchido até cerca de 1 cm de sua borda (volume de aproximadamente 3,9 ml, em média).

7 — O tubo contendo a suspensão tamisada foi submetido à centrifugação a 2500 rpm (1397 g) durante 1 minuto (tempo considerado após ter sido atingida a velocidade de centrifugação estipulada).

8 — O líquido sobrenadante foi desprezado emborcando-se o tubo num movimento rápido e único, sendo imediatamente voltado para seu sentido anterior após esgotar-se o fluxo contínuo de escoamento do sobrenadante.

9 — O sedimento resultante foi desagregado por agitação lateral vigorosa do tubo-de-ensaio.

10 — A adição de água destilada aos poucos, ao sedimento, até cerca de 1 cm da borda do tubo, foi alternada com agitação do mesmo, visando-se a uma suspensão homogênea.

11 — O processo de “lavagem do sedimento” (itens 10, 7, 8 e 9, nesta ordem) foi repetido uma vez.

12 — Adicionou-se ao sedimento, aos poucos, a solução de sulfato de zinco (massa específica 1180 kg/m³) até cerca de 1 cm da borda do tubo de-ensaio, alternando-se com agitação do mesmo. Cuidou-se para que a suspensão se apresentasse homogênea à observação visual.

13 — A suspensão foi submetida à centrifugação a 2500 rpm (1397 g) durante 1 minuto. O tubo foi cuidadosamente retirado do centrifugador, sendo a colheita de material flutuante feita dentro de aproximadamente 1 minuto.

14 — Removeu-se material flutuante do centrifugado usando-se a alça, colocada em contato com a superfície líquida e retirada cuidadosamente em seguida. Durante esta operação, a alça permaneceu paralela à superfície líquida.

15 — O material removido foi colocado sobre lâmina para microscopia anteriormente identificada, onde foi misturado, usando-se a alça, com uma gota de solução de Lugol previamente colocada sobre a lâmina.

16 — Transferiu-se o máximo de líquido existente na alça, por sucessivos toques da mesma sobre áreas secas da lâmina, próximas de onde o material removido foi colocado.

17 — A suspensão formada de material flutuante retirado e solução de Lugol foi homogeneizada por meio de movimentos circulares de um dos cantos de uma lamínula.

18 — Uma aresta da lamínula foi colocada paralela e proximamente a uma das bordas longitudinais da lâmina. Inclinando-se adequadamente o conjunto, a suspensão acumulou-se no ângulo diedro formado.

19 — Deitou-se a lamínula sobre a lâmina, tendo-se o cuidado de evitar a formação de bolhas.

20 — A preparação foi, então, levada para exame ao microscópio.

PARTE EXPERIMENTAL

Retiraram-se 10 alçadas sucessivas de material flutuante. Após cada retirada, o tubo contendo o material remanescente foi vigorosamente agitado (após ser fechado com película “Parafilm”) e centrifugado (1397 g) durante 1 minuto. Foram utilizadas 3 amostras fecais contendo cistos de *E. coli* e uma contendo cistos de *G. lamblia*, sendo para cada amostra desenvolvidos 2 experimentos independentes. Cada experimento (de um total de 8, portanto) constituiu-se de contagens de elementos parasitários em 10 preparações referentes às alçadas retiradas de uma mesma suspensão.

Sabendo-se que a precisão de contagens por amostragem é função da raiz quadrada do número de elementos contados^{8, 14} e dada a elevada quantidade de cistos presentes nas preparações examinadas, optou-se pela contagem dos mesmos em 36 campos microscópicos, em cada preparação. Estes campos foram distribuídos igualmente em 4 colunas de campos, paralelas entre si e perpendiculares ao eixo maior da preparação; cada coluna distou 4 mm da adjacente e da borda da lamínula (quando vizinha à mesma). Em cada coluna, o centro de um campo distou 2 mm do adjacente ou da borda da lamínula perpendicular à coluna. A escolha do aumento microscópico dependeu da numerosidade de cistos por campo: cistos de *E. coli* foram observados sob aumento de 100 vezes e os de *G. lamblia*, sob aumento de 400 vezes.

Resultados das contagens sugeriram que as quantidades de elementos parasitários retirados por alçadas sucessivas guardavam entre si razão aproximadamente constante. Assim, foi elaborado modelo matemático com o qual foram comparados os dados empíricos e verificado seu ajustamento. O processamento dos dados foi feito após conversão dos mesmos em valores facilmente comparáveis: estipulou-se como sendo igual a 100 o número total dos elementos removidos em cada experimento.

RESULTADOS

Resultados de contagens de elementos parasitários no material transferido por alçadas sucessivas (Tabela 1) forneceram dados que, comparados com o modelo matemático, permitiram

obter estimativas da proporção de elementos parasitários retirados por determinado número de alçadas sucessivas (Tabela 2). O modelo logarí-

TABELA 1

Valores médios relativos às quantidades de elementos parasitários (EP) transferidos por alçadas sucessivas, em 8 séries de ensaios (contagens de EP em 10 preparações provenientes de alçadas sucessivas).

Ordem da alçada	Valores médios
1	28,0
2	23,6
3	15,4
4	10,6
5	8,0
6	5,3
7	3,2
8	3,0
9	1,9
10	1,1

Equações: $y = Q \cdot d \cdot (1 - d)^{x-1}$ (1)

x = número de ordem da alçada ($1 \leq x \leq 10$)

y = número de EP retirados

Q = número total de EP existentes no material flutuante

d = proporção de retirada de EP

$Y = A + B(x - 1)$ (2)

Y = log y

A = log Q + log d

B = log (1 - d)

coeficiente de determinação (r^2) = 0,9919

TABELA 2

Quantidades estimadas de EP transferidos por sucessivas alçadas. As quantidades expressas como percentagens simples relacionam-se com a ordem de retirada das alçadas e as expressas como percentagens acumuladas, com o número de alçadas retiradas.

Ordem da alçada ou número de alçadas	percentagens	
	simples	acumuladas
1	30,0	30,0
2	21,0	51,0
3	14,7	65,7
4	10,3	76,0
5	7,2	83,2
6	5,0	88,3
7	3,5	91,8
8	2,5	94,2
9	1,7	96,0
10	1,2	97,2

Equação: $y = Q \cdot d \cdot (1 - d)^{x-1}$

x = número de ordem da alçada

y = número de EP retirados (em percentagem)

Q = número total de EP existentes no material flutuante = 100%

d = proporção de retirada de EP = 30,0%

mico adotado indicou a conveniência de usar 5 alçadas, ao todo, que deverão retirar, teoricamente, 83% do total de elementos parasitários flutuantes (Figura 1), sendo calculada em 30% a proporção dos elementos parasitários retirados, a cada alçada, em relação aos pré-existentes.

DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

Em experimentos prévios verificou-se que, quando os diâmetros do tubo-de-ensaio e da alça pouco diferem, não ocorre a retirada de material flutuante, pois a película forma-se entre a parte externa da alça e a parede interna do tubo, rompendo-se com o afastamento entre ambos. Mesmo quando obtida a película por meio de alça com diâmetro pouco menor, movimentos involuntários que estabeleçam contato desta com a parede do tubo causam transferência do líquido para esta superfície. Sendo fixos os diâmetros do tubo-de-ensaio, foram confeccionadas alças de dimensões que proporcionassem à retirada de material flutuante rendimento máximo, considerando as limitações citadas para seu diâmetro, que foi de 4,5 mm (diâmetro externo).

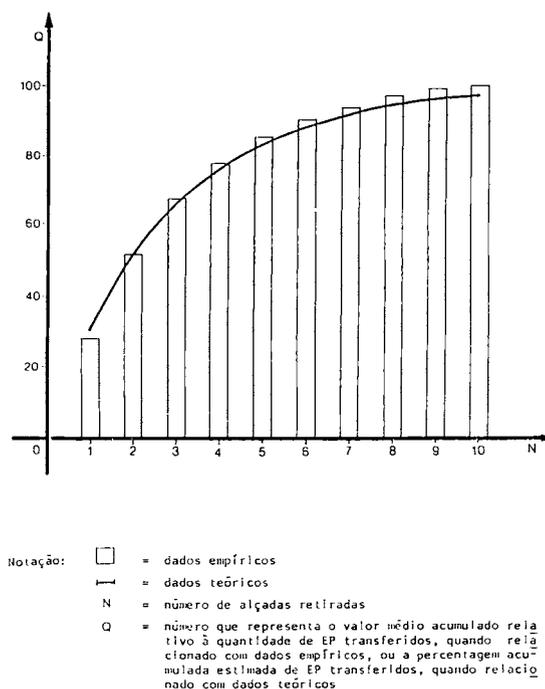


Fig. 1 — Confrontação entre valores médios empíricos e valores estimados (em percentagens), de quantidades acumuladas de EP retirados em 10 alçadas sucessivas.

A homogeneização seguida de centrifugação, após cada retirada de material flutuante, visou a proporcionar, tanto quanto possível, igual probabilidade de distribuição de elementos parasitários na película superficial, tornando-se os resultados menos sujeitos a variações e possibilitando desenvolvimento de menor número de ensaios para estudo do fenômeno.

Aceito o ajustamento dos dados empíricos à equação deduzida, que indicou ser retirada a cada alçada proporção constante dos elementos parasitários flutuantes remanescentes (30%), admitiu-se que sucessivas alçadas tenderiam, no limite, a recuperar a totalidade destes elementos. Este desiderato teórico poderia ser aproximado, exigindo, entretanto, um número excessivamente grande de alçadas (Tabela 2 e Figura 1). Sabendo-se que a cada sucessiva retirada decresce a quantidade de elementos parasitários transferidos para a lâmina, torna-se importante estabelecer, em termos teóricos, o menor número de alçadas de que se pudesse esperar a transferência da grande maioria dos elementos parasitários. As primeiras 5 alçadas de material flutuante permitiram obtenção de, em média, 83% dos elementos parasitários contidos na película superficial, o que sugere sua adequação ao método.

A representação gráfica de quantidades de elementos parasitários retirados por sucessivas alçadas (Figura 1) visou a salientar a contribuição das primeiras alçadas para a retirada dos elementos parasitários flutuantes. Sua confrontação com os valores médios empíricos acumulados, obtidos da Tabela 1, demonstrou o ajustamento destes à equação formulada.

SUMMARY

The method of FAUST et al: Removal of floating material by using a metallic loop.

The efficiency of the use of a wire loop for the removal of floating parasitic elements was investigated. The quantity of elements removed by each successive loopfull was confronted with a logarithmic model which indicated that each loopfull carried about 30% of the remaining floating parasitic elements. It was estimated that the first five loopfulls carried a total of 83% of

the floating parasitic elements, being this adequate procedure for the method under investigation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMATO NETO, V.; CAMPOS, R. & FERREIRA, C. S. — *Diagnóstico de parasitoses intestinais pelo exame de fezes*. São Paulo, Prociex, 1961. p. 85-88.
2. AMATO NETO, V. & CORRÊA, L. L. — *Exame parasitológico das fezes*. São Paulo, Sarvier, 1980. p. 53-55.
3. ARAÚJO, C. F. F. M. — *Aspectos teórico-práticos do emprego da técnica de KATO & MIURA em coproscopia quantitativa*. São Paulo, 1983. (Dissertação de Mestrado — Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).
4. BARRETO, M. P. — *Diagnóstico da amebíase crônica: estudo comparativo da eficiência dos métodos de FAUST e col. e de TELEMANN-RIVAS, usados sós ou combinados com o exame de esfregaços corados pela hematoxilina férrica*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 2: 305-312, 1960.
5. BLAGG, W.; SCHLOEGEL, E. L.; MANSOUR, N. S. & KHALAF, G. I. — *A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces*. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 4: 23-28, 1955.
6. CASTILHO, V. L. P.; FRANÇA, I. L.; MONTEIRO, C. J. A.; AMATO NETO, V.; CAMPOS, R. & MOREIRA, A. A. B. — *Estudo comparativo entre os métodos de FAUST & col. e de RITCHIE, para exame parasitológico das fezes*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 22: 319-322, 1980.
7. CRAIG, C. F. & FAUST, E. C. — *Clinical parasitology*. 2. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1941. p. 653-655.
8. DACIE, J. V. & LEWIS, S. M. — *Hematologia práctica*. 2. ed. Barcelona, Toray, 1974. p. 22-27.
9. FAUST, E. C.; D'ANTONI, J. S.; ODOM, V.; MILLER, M. J.; PERES, C.; SAWITZ, W.; THOMEN, L. F.; TOBIE, J. & WALKER, J. H. — *A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. I. Preliminary communication*. *Amer. J. trop. Med.*, 18: 169-183, 1938.
10. FAUST, E. C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C. & LINCICOME, D. R. — *Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminth in feces*. *J. Parasit.*, 25: 241-262, 1939.
11. FAUST, E. C. & RUSSEL, P. F. — *Craig and Faust's clinical parasitology*. 7. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1964. p. 973.
12. FERREIRA, L. F. — *O exame parasitológico das fezes — estudo comparativo das principais técnicas*. *Hospital (R. de Janeiro)*, 70: 347-368, 1966.
13. LANE, C. — *Hookworm diagnosis. Assumptions, alterations, controls, time-lag, rediscoveries: D.C.F.* *Trans. roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 33: 521-536, 1940.

14. MIALE, J. B. — *Laboratory medicine: hematology*. 4. ed. Saint Louis, Mosby, 1972. p. 632-640.
15. PESSÓA, S. B. & MARTINS, A. V. — *Parasitologia médica*. 10. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1978.
16. REY, L. — *Parasitologia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1973.
17. RIBEIRO, V. M. — Método de alta concentração para pesquisa de ovos de vermes e cistos de protozoários intestinais. *Med. Cirurg. Farm.*, 197: 430-431, 1952.
18. SACRAMENTO, W. — Observações sobre processos de enriquecimento de ovos e larvas de helmintos e de cistos de protozoários, nas fezes, com especial referência ao método de FAUST. *Rev. Med. (S. Paulo)*, 24: 67-73, 1940.
19. TOBIE, J. E.; REARDON, L. V.; BOZICEVICH, J.; SHIH, B. C.; MANTEL, N. & THOMAS, E. H. — The efficiency of the zinc sulfate technic in the detection of intestinal protozoa by successive stool examinations. *Amer. J. trop. Med.*, 31: 552-560, 1951.

Recebido para publicação em 10/8/1990.

Aceito para publicação em 07/11/1990.